

Aus dem Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik

Direktor: Prof. Dr. David Jones

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Vergleichende *in vitro* – Analyse
von allogenen Knochentransplantaten
- 121°C Autoklavieren vs. 25kGy γ -Bestrahlung -

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Simon Martin Heinz

aus

Marburg

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 30.10.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan:	Prof. Dr. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. Dr. A. Wilke
1. Korreferent:	PD Dr. R. Stiletto
2. Korreferent	Prof. Dr. H. Stürz
3. Korreferent	Prof. Dr. G. Richter

**Vergleichende *in vitro* – Analyse
von allogenen Knochentransplantaten
- 121°C Autoklavieren vs. 25kGy γ -Bestrahlung -**

von

Simon Martin Heinz

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	9
1.1 Knochentransplantation	9
1.2 Geschichte der Knochentransplantation und der Knochenbanken	10
1.3 Integration des implantierten Knochenmaterials	11
1.4 Effekte der Sterilisationsverfahren auf das allogene Knochentransplantat	13
1.5 Zellkultur	15
1.6 Zytokine und ihre Wirkung auf den Knochenstoffwechsel	16
1.6.1 Interleukin-1 β (IL-1 β).....	16
1.6.2 Interleukin-6 (IL-6).....	17
1.6.3 Interferon- γ (IFN- γ)	17
1.6.4 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).....	18
1.7 Enzyme und Stoffwechselprodukte	19
1.7.1 Lactat	19
1.7.2 Lactat-Dehydrogenase (LDH)	20
1.7.3 Alkalische Phosphatase (AP).....	20
 2 Fragestellung	 22
2.1 Problemstellung	22
2.2 Zielsetzung der Arbeit	25
 3 Material und Methoden.....	 26
3.1 Gewinnung der Femurköpfe	26
3.2 Herstellung der Knochentransplantate.....	27
3.2.1 Zuschneiden der Hüftköpfe	27
3.2.2 Bohren der Spongiosazylinder.....	29
3.2.3 Messen der Spongiosascheiben	30
3.2.4 Entfettung der Spongiosazylinder.....	30
3.3 Knochensterilisationsverfahren	30

3.3.1	Gammabestrahlung 25 kGy	30
3.3.2	Autoklavieren 121°C	33
3.4	Knochenmarkspräparation und Zellgewinnung.....	34
3.5	Versuchdesign und Kulturbedingungen des 12-Wochen-Versuchs	38
3.6	Versuchdesign des FACS- Versuchs	40
3.7	Probenmanagment	42
3.8	Zellkultur-Medium.....	43
3.8.1	Messung der Medium-Osmolalität am Osmometer	44
3.9	Untersuchungsparameter	45
3.10	Dokumentation der Zellkulturen.....	46
3.11	Bestimmung der Zellzahlen im abgesaugtem Medium mittels CASY®1– Zellzähler	47
3.12	Messung der AP, Lactatkonzentration und LDH.....	48
3.13	Zytokinbestimmungen	50
3.14	Rasterelektronenmikroskopie	52
3.15	Durchflusszytometrie - FACS	54
3.16	Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblaufärbung	58
3.17	Giemsa Färbung:.....	59
3.18	Knochenprobenfixation	60
3.19	Histologisches Dünschnittverfahren	63
3.20	Färbung der Technovit-Dünnschnitte	66
3.21	Versuchsmaterialien.....	70
3.22	Statistik	75
3.23	Standardisierbarkeit	78

4 Ergebnisse..... 79

4.1	Kontrolle nach 12-Wochen Kultur	79
4.1.1	Zellzahlbestimmung aus dem Mediumüberstand	82
4.1.2	Zytokinprofile der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen	84
4.1.2.1	Zytokinprofil der Kontrollkulturen für Interleukin-6.....	84
4.1.2.2	Zytokinprofil der Kontrollkulturen für IFN- γ	86
4.1.2.3	Zytokinprofil der Kontrollkulturen für Interleukin-1 β	87
4.1.2.4	Zytokinprofil der Kontrollkultur für TNF- α	88
4.1.3	Lactatwerte und Enzymprofil der Zellkulturen ohne behandelte Knochenprobenkörper	89

4.1.3.1	Profil der Lactatwerte der Kontrollkulturen	89
4.1.3.2	Enzymprofil der Lactatdehydrogenase der Kontrollkulturen	91
4.1.3.3	Enzymprofil der Alkalischen Phosphatase der Kontrollkulturen	92
4.1.4	FACS der Kontrollkulturen	94
4.2	Humane Knochenmarkszellkulturen auf behandelten Knochenproben.....	96
4.2.1	Humane Knochenmarkszellkulturen kultiviert auf 121°C autoklavierten Knochenproben	96
4.2.2	Humane Knochenmarkszellkulturen kultiviert auf 25kGy γ -bestrahlten Knochenproben	98
4.2.3	Zellzahlbestimmungen aus den Mediumüberständen der verschiedenen Kulturen	99
4.2.4	Exemplarische Graphenveränderung der Mediumüberstände der humanen Knochenmarkszellkulturen auf behandelten Knochenproben	101
4.2.4.1	Kultur: Zellen kultiviert auf 121°C autoklavierten Knochenproben	101
4.2.4.2	Kultur: Zellen kultiviert auf 25 kGy γ -bestrahlten Knochenproben	103
4.2.5	Vitalitätsbestimmung mit der Trypanblaufärbung.....	105
4.2.6	Direktfärbung der Spongiascheiben mit Trypanblau	106
4.2.7	FACS – Analyse der verschiedenen Kulturen	109
4.2.8	Zytokinprofil der Zellkulturen unter Exposition mit behandelten Knochenprobenkörper	111
4.2.8.1	Zytokinprofil für Interleukin-6	111
4.2.8.2	Zytokinprofil für Interleukin – 6 ab Tag 36 nach Aussaat.....	113
4.2.8.3	Zytokinprofil für Interleukin – 1 β	116
4.2.8.4	Zytokinprofil für Interferon – γ	118
4.2.8.5	Zytokinprofil für TNF – α	120
4.2.9	Lactatwerte und Enzymprofil der Zellkulturen unter Exposition mit behandelten Knochenprobenkörper	122
4.2.9.1	Profil der Lactatwerte	122
4.2.9.2	Profil der Lactatwerte ab Tag 36 nach Aussaat	124
4.2.9.3	Enzymprofil der Lactatdehydrogenase	127
4.2.9.4	Enzymprofil der Lactatdehydrogenase ab Tag 36 nach Aussaat	129
4.2.9.5	Enzymprofil der Alkalischen Phosphatase	132
4.2.10	pH-Wert-Änderungen im 12-Wochen-Versuchdesign	134
4.2.11	Mikroskopische Bilder.....	135
4.2.12	Rasterelektronische Bilder der Zellkulturen nach 12 Wochen	143

5	Diskussion	149
6	Zusammenfassung.....	162
7	Abbildungsverzeichnis.....	163
8	Literaturverzeichnis.....	167
9	Abkürzungsverzeichnis.....	179
10	Danksagungen	183
11	Ehrenwörtliche Erklärung	184
12	Verzeichnis der akademischen Lehrer	185
13	Lebenslauf.....	186
14	Anhang	187
14.1	Anamnesebogen zur Knochenspende	187
14.2	Zertifikat der durchgeführten 25kGy γ -Bestrahlung der Knochenproben.....	189

Einleitung

1.1 Knochentransplantation

Im Rahmen der Wiederherstellungschirurgie des Skelettsystems und der Bewegungsorgane berichtet der Wissenschaftliche Beirat der Bundesärztekammer über die Notwendigkeit des Knochenersatzes. In Zahlen ist dieser bei ca. 15% der Operationen am Skelettsystem und 50% bei rekonstruktiven Eingriffe am Innenohr von Nöten [Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer 1996]. Knochentransplantation als Therapieverfahren bei großen Knochenverlusten, Pseudarthrosen, Tumoren, Osteitiden, Zysten, Mehrfragment- und Trümmerfrakturen ermöglicht eine frühere Wiedererlangung der Funktion des jeweiligen Skelettabschnitts und demnach auch eine schnellere Rehabilitation des Patienten. Jedoch müssen sowohl an autologe, isologe, allogene und xenogene Knochentransplantate, sowie an Knochenersatzstoff verschiedene Anforderungen gestellt werden, die im Idealfall alle erfüllt sein sollten [v.Garrel et al. 1998].

Der geschwächte Skelettabschnitt muss durch das Transplantat eine bestimmte Belastbarkeit erlangen. Demnach müssen vom Material mechanische Eigenschaften erwartet werden, die eine stabile Osteosynthese garantieren.

Weiterhin darf es zu keiner immunologischen Abstoßungsreaktion durch den transplantierten Knochen, -ersatzstoff kommen. Jedoch soll das Transplantat die Induktion der Knochenneubildung, sowie die Revaskularisierung erleichtern, unterstützen und fördern.

Auch Oberfläche und Architektur des Transplantats sind wichtig, um als Leitschiene die Osteokonduktion des Transplantats zu verbessern. Logistisch sind für die Verarbeitung wichtige Kriterien zu erfüllen, hier seien Sterilität, kostengünstige Herstellung, leichte Lagerung und Formbarkeit genannt.

Qualitativ muss also versucht werden, mit Hilfe des Transplantats an der Defektstelle die „gesunden“, biomechanischen Eigenschaften des Skelettabschnittes wiederzuerlangen. Es existiert bis heute kein Material, das die oben genannten Kriterien in Gänze erfüllt.

1.2 Geschichte der Knochentransplantation und der Knochenbanken

Im Jahr 1668 wurde einem jungen russischen Soldaten durch den Holländer Job von Meekeren nach einer Verletzung des Schädelknochens ein Hundeknochen eingesetzt. Dieses Xenograft sollte jedoch später wieder entfernt werden, da dem Soldaten die Exkommunizierung aus der Kirche drohte. Zum religiösen Leidwesen des Patienten war dies aufgrund des guten Einheilens des Knochens nicht mehr möglich [DeBoer 1989]. Diese kleine Anekdote zeigt, dass sich bei der operativen Behandlung von Knochendefekten damals wie heute auf die verschiedenste Weise Therapieprobleme entstehen können.

Im Jahre 1881 konnte MacEwen erstmalig über die Transplantation eines allogenen Transplantats berichten [MacEwen 1881].

Als weitere Quellen sind die Arbeiten von Lexer zu nennen, der die septische Arthritis und die Osteomyelitis mit Hilfe von frischen Amputaten mit Erfolg versorgte, also auch größere Knochendefekte behandeln konnte [Lexer 1908, Lexer 1925].

Um die Jahrhundertwende war es möglich allogene Knochentransplantate zu transplantieren, doch favorisierten die Chirurgen weiterhin die autologe Knochenspende. Die Gründe hierfür waren vielgestaltig. Juristisch war die Rechtslage zum Thema „Transplantation“ für Arzt, Patient und Spender nicht geklärt. Ethisch und religiös dürften, wie oben schon beschrieben, ebenfalls Bedenken bestanden haben. Die Hauptproblematik der allogenen Knochentransplantation stellte jedoch die Verfügbarkeit von frischem Knochenmaterial dar.

Über die Erfahrungen französischer Kriegschirurgen, die Knochen monatelang kühl lagerten, wurden durch Carrel 1912 berichtet. Mit seinen Empfehlungen zur Lagerung von Organen und Gewebe gilt er als Vater der Kältekonserverung und damit wohl auch der Knochenbanken [Carrel 1912].

Die Gründung der Navy Tissue Bank in Bethesda, Maryland, hatte zwar eher militärische Hintergründe, doch brachte die dortige Forschung unter Hyatt endlich akzeptablere Lösungen für die Verwahrung und Verfügbarkeit von allogenen Knochentransplantaten [Hyatt 1950]. Aus diesen Strukturen bildeten sich in den USA

kommerzielle Organisationsstrukturen, welche die Transplantatbereitstellung heutzutage in überregionalen Gewebebanken organisieren.

In Deutschland kam es nicht zu einer solchen Entwicklung, da die Notwendigkeit der Zulassung als Arzneimittel, verbindlich für allogene Gewebetransplantate, solchen Bestrebungen einen Riegel vorschob. Es etablierten sich aber kleine, hauseigene Knochenbanken, da die Arzneimittelzulassung für vor Ort entnommen und transplantierte Knochentransplantate klinikintern umgangen werden konnten.

Durch verschiedene Veröffentlichungen über das Übertragungsrisiko von viral und bakteriell kontaminierten Knochentransplantaten wurde klar, dass Leitlinien und ein Goldstandard für Knochenbanken gefunden werden musste [James 1953, Shutkin 1954, Centers for Disease Control 1988, Eggen and Nordbo 1992, Conrad et al. 1995].

In verschiedensten internationalen Gremien, wie z.B. der European Association of Tissue Banks (EATB) und der European Association of Musculo Skeletal Transplantation (EAMST) [EATB/EAMST 1997] wurden Standards erarbeitet die ein Übertragungsrisiko minimieren. Die Bundesärztekammer tat dies mit der Veröffentlichung der „Richtlinien zum Führen einer Knochenbank“, welche die Auswahl von Lebend- und Leichenspendern festlegt [Bundesärztekammer 2001].

Verschiedenste Methoden, wie zum Beispiel physikalische Sterilisation durch Gammabestrahlung, chemische Behandlung mit PES/Ethanol, Tutoplast®-Verfahren oder Wärmeverfahren, wie Autoklavieren, werden derzeit angewandt und sollen eine maximale Keim- und Virusinaktivierung garantieren.

Damit scheint die Gefahr des Übertragungsrisikos für den Empfänger des Transplantates genügend gebannt und die Verfügbarkeit von allogenem Spenderknochen gewährleistet.

1.3 Integration des implantierten Knochenmaterials

Das optimale Knochentransplantat soll in kurzer Zeit die Aufgaben des geschwächten Skelettabschnitts übernehmen. Dies erfordert die schnelle Inkooperation und Durchbauung des Transplantats. Die Fähigkeit des Transplantats von sich aus nichtdifferenzierte Stamm- und Osteoprogenitorzellen in Osteoblasten umzuwandeln

und damit eine schnelle Knochenneubildung zu erwirken, nennt man Osteoinduktion [Urist 1967, Boyce et al. 1999].

Diese wird durch die im Knochentransplantat noch enthaltenen Zellen, verschiedenste Botenstoffe und zellulärer Komponenten erreicht. Das 'bone morphogenetic protein' (BMP) als lösliches Glykoprotein scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen [Albrektsson und Johansson 2001, Reddi 1998].

Unterstützt das Transplantat, zum Beispiel durch seine Oberfläche, das Einwandern und die Bindung von Osteoblasten, Osteoprogenitorzellen und anderen osteogenen Zellen spricht man von Osteokonduktion [Boyce et al. 1999].

Als einziges Transplantat besitzt das autologe Knochentransplantat die Fähigkeit sowohl osteoinduktiv als auch osteokonduktiv zu wirken. Dadurch können Inkooperation und Durchbauung am schnellsten erreicht werden.

Im frischen, unprozessierten, allogenen Knochentransplantat wird die Osteoinduktion nach Implantation dadurch verhindert, dass die Immunabwehr des Patienten die als „fremd“ erkannten osteoinduktiven zellulären Bestandteile des Knochentransplantats zerstört. Es kommt zu einer zellulären Immunantwort und Abstoßungsreaktion. Im Zuge dieser Zerstörung kann die umliegende Gewebematrix ebenfalls in Mitleidenschaft gezogen werden [Galea und Kearney 2005].

Die logistische Einhaltung der „Richtlinien zum Führen einer Knochenbank“ macht eine sofortige Transplantation von allogenen Knochen in einen Empfänger unmöglich, d.h. man kann davon ausgehen, dass allogener Knochen vor einer Implantation zuerst einem etablierten Verfahrensprozess zugeführt wird. Durch den logistischen Verfahrensprozeß verstreicht zum einen Zeit, zum anderen werden biologische Wirkungen im Transplantat erreicht, die Veränderung der osteogenen Eigenschaften bedingen.

Sowohl autologe, wie allogene Knochentransplantate zeichnen sich durch ihr „natürliches“ Design, also der physiologischen Architektur und Morphologie aus. Dadurch ist den Knochentransplantaten eine Oberfläche und Form gegeben, die eine knöcherne Durchbauung fördern.

Bei der Operation werden am Knochen und im Gewebe Traumata gesetzt, die zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Blut, Fibrin und extrazellulärer Flüssigkeit führen. Gewebematerial und tote Zellen im und um das implantierte allogene Knochentransplantat werden durch Macrophagen entfernt. Kapillaren aus dem

anliegenden Wundbett wachsen dreidimensional in die entstandenen porösen Hohlräume des Knochentransplantats ein. Auf diese Weise finden mesenchymale Zellen, Osteoklasten, Osteoblasten und perivaskuläres Gewebe ihren Weg in das Knochentransplantat. Die Osteoklasten lagern sich über Rezeptoren an ihrer Oberfläche der Spenderknochenmatrix auf und werden durch Ansäuerung proteolytisch wirksam [Väänänen, 1996]. Es bilden sich Resorptionslagunen (sog. nach John H. Howship 1781-1841). Diese Resorptionslagunen füllen sich mit aus mesenchymalen Vorläuferzellen differenzierten Osteoblasten, die eine Kollagenmatrix bilden, aus der sich unter Einfluss von Knochenproteinen, z.B. Osteocalcin, das Osteoid bildet. Darauf folgend kommt es zur Reifung des Osteoids unter osteoblastärer Kontrolle und Mineralisation der Matrix. Auf diese Weise wird nach und nach der gesamte allogene Spenderknochen ein- und umgebaut [Raisz 1999].

1.4 Effekte der Sterilisationsverfahren auf das allogene Knochentransplantat

Die Transplantatsicherheit hat höchste Priorität in der allogenen Knochentransplantation. Neben dem serologischen Spenderscreening auf spezifische Antikörper werden verschiedenste Sterilisations- und Desinfektionsverfahren im Bereich der allogenen Knochentransplantation angewandt, um eine mögliche Kontamination zu eliminieren. Angestrebt wird ein 'sterility-assurance level' (SAL) von 10^{-6} . Mit den gängigen Sterilisationsverfahren scheint dies erreicht.

Der Sterility assurance level, kurz SAL- Wert genannt, definiert die Wahrscheinlichkeit, dass ein einzelnes Produkt nach dem Sterilisierungsprozess trotzdem kontaminiert ist. Ein SAL-Wert von maximal 10^{-6} sagt aus, dass unter einer Million Produktproben maximal eine mit einem lebensfähigen Keim kontaminiert sein darf. Man benutzt den SAL zur Bewertung von Sterilisierungsprozessen.

Allerdings wirkt, wie oben schon beschrieben, der allogene Knochen unbehandelt ebenfalls immunogen. Deshalb wird versucht, die zu erwartende Immunantwort durch Prozessionierung der allogenen Knochentransplantate zu reduzieren [Kuner, 1998].

Jedoch zeigen bestehende Studien, dass die biomechanischen Eigenschaften der allogenen Knochentransplantaten durch die verschiedene Sterilisationsverfahren

entscheidend verändert werden [Godette et al. 1996, Knaepler et al. 1991, Shin et al. 2005].

Folgend sollen die beiden in dieser Studie angewendeten Sterilisationsverfahren vorgestellt und entstehende Effekte erklärt werden:

ionisierende γ -Strahlung 25kGy

In großen Knochenbanken ist γ -Strahlung aus Cobalt 60 Quellen ein standardmäßig genutztes Verfahren für die Sterilisierung von allogenen Knochentransplantaten [Kennedy et al. 2005]. Die International Atomic Energy Association (IAEA) empfiehlt eine Standarddosis von 25 kGy [IAEA, 2002]. Dabei wird das 'sterility-assurance level' (SAL) von 10^{-6} bei dieser Strahlendosis von 25kGy erreicht.

Jedoch werden in den Knochenbanken unterschiedlichste Strahlendosen angewendet [Vangness et al. 1996]. Für die Sterilisation von Knochenmaterial liegen die angewendeten Dosen dabei zwischen 10-35kGy. Ein Grund hierfür scheint die Schwierigkeit zwischen dem Finden einer optimalen Strahlendosis für die Sterilisation und dem Verhindern von biologisch schädlichen Effekten auf den Knochen zu sein.

Die biologische Festigkeit des Knochenmaterials wird durch Dosen >20kGy erheblich herabgesetzt. Direkte Treffer von γ -Strahlen verursachen Schäden an den Oberflächen und führen zu Spaltungen an Polypeptidketten. Indirekt werden durch Radikalbildung kollagene Strukturen in Mitleidenschaft gezogen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten diese strukturellen Veränderungen an bestrahltem Knochenmaterial aufzeigen [Akkus et al. 2005, Anderson et al. 1992, Currey et al. 1997].

121°C Autoklavierung

Die Reduzierung der Antigenität der allogenen Knochentransplantate kann auch durch Autoklavieren (Wasserdampfbehandlung) erreicht werden [Llyod-Robert 1952; Wagner et al. 1989]. Prinzip hierbei ist durch die thermische Behandlung Nukleinsäuren und Proteine zu koagulieren und zu zerstören. Jedoch führt das Autoklavieren auch zur Zerstörung osteoinduktiver Proteine, beispielsweise kommt es zu einem völligen

Wirkverlust des BMP [Urist 1967]. Auch die osteokonduktiven Eigenschaften der autoklavierten Knochentransplantate werden negativ beeinflusst. Es kommt zu einem extremen Festigkeits- und Strukturverlust [Vogenreiter et al. 1994]. Diese Beeinträchtigungen werden durch hitzebedingte Veränderungen an den kollagenen Strukturen erklärt [Knaepler et al. 1994].

1.5 Zellkultur

Im Rahmen dieser Studie sollen Aussagen über die biologische Verträglichkeit von verschiedenen Knochensterilisationsverfahren gemacht werden. Unsere Arbeitsgruppe versuchte mit einem in vitro-Modell dieser Fragestellung gerecht zu werden.

Die Problematik verschiedener Zellkulturmodelle ist aber, dass sie unter identischen Kulturbedingungen Sensitivitätsunterschiede aufweisen [Johnson et al. 1983]. Bedient man sich hochdifferenzierter Zelllinien, wie z.B. Osteoblasten oder Osteoklasten, entfallen Aussagen über Differenzierungsveränderungen der Zellkultur, da eine Differenzierungspotenz durch die Entdifferenzierung der verwendeten Zelllinie nicht mehr gegeben ist. Weiteres Kriterium muss die Übertragbarkeit der gewonnenen Daten auf die Situation „in vivo“ sein, d.h. eine möglichst exakte Simulation der „in vivo“-Verhältnisse durch die Zellkultur.

Für uns war deshalb die humane Knochenmarkszellkultur, das in vitro-Modell der Wahl. Dieses Zellkulturmodell wurde seit 1991 durch die Arbeitsgruppe um Wilke für Biokompatibilitätsprüfungen von Biomaterialien benutzt und hat bewiesen, dass die humane Knochenmarkszellkultur höchsten Ansprüchen genügt [Wilke et al. 1992 – 2005]. Gerade die Entnahme der Zellen am Ort des klinischen Einsatzes der Knochentransplantate spricht für die Nähe der „in vivo“-Situation. Weiterhin ist durch das Spektrum an undifferenzierten Zellen im gewonnen Zellpool eine Differenzierungspotenz der Zellkultur in die eine oder andere Richtung möglich.

Für die Beschreibung des geschichtlichen Hintergrunds des Knochenmarkszellkulturverfahrens wird auf die Arbeiten von Allen, Dexter, Charbord und Kalla verwiesen [Allen 1981, Dexter et al. 1976; 1984, Charbord et al. 1986, Kalla et al. 1992].

1.6 Zytokine und ihre Wirkung auf den Knochenstoffwechsel

Die Zellen des menschlichen Körpers benutzen verschiedene Wege der Kommunikation untereinander. Neben den Neurotransmittern und Hormonen stellen die Zytokine wichtige Botenstoffe und Kommunikationsmittel dar. Jede kernhaltige Zelle kann Zytokine produzieren, wobei Art und Quantität der Zytokinproduktion von der jeweiligen Zellart, dem Aktivierungsgrad und der Differenzierungsphase der Zelle abhängen.

1.6.1 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Aktivierte Makrophagen und Neutrophile-Zellen sind in der Lage IL-1 zu produzieren, jedoch können auch tote Zellen, Osteoklasten, Fibroblasten und Endothel-Zellen IL-1 Produktionsstätten sein [Horowitz et al. 1989 a,b,c,]. Es sind für IL-1 zwei verschiedene Typen von Rezeptoren bekannt [Dinarello 1991-1995]. Die biologischen Wirkungen von IL-1 werden über den Typ-I-Rezeptor vermittelt [Sims et al. 1993] und erfolgen intrazellulär, z.B. über die Aktivierung der Adenylat-Cyclase. IL-1 wirkt pleiotrop und kann lokale, wie systemische Wirkungen in verschiedener Hinsicht zeigen. Es kann T-Helferzellen zur Sekretion von IL-2 und B-Zellen direkt zur Produktion von Immunglobulinen anregen. Weiterhin stimuliert es die Aktivierung von NK-Zellen, Fibroblasten und Thymozyten. In Verbindung mit TNF sind verschiedene Veränderungen im Endothel beschrieben und zusammen mit anderen Zytokinen sei als Hauptcharakteristikum die Stimulierung des Arachidonsäure-Metabolismus in der Entzündungsreaktion genannt. IL-1 stimuliert zusammen mit TNF die Knochenresorption, ist aber ebenfalls in der Lage die Knochenneubildung zu beeinflussen [Canalis 1986]. Es kann durch Hochregulierung von koloniestimulierenden Rezeptoren oder direkt über eine Steigerung der Synthese von Wachstumsfaktoren, z.B. GM-CSF, verschiedene Prozesse beeinflussen.

1.6.2 Interleukin-6 (IL-6)

Die Hauptquellen für in vivo produziertes IL-6 sind stimulierte Fibroblasten, Monozyten und Endothelzellen. Jedoch können nach entsprechender Stimulation auch Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, Mastzellen, Gliazellen und Keratinozyten IL-6 produzieren. Als BCDF (B cell differentiation factor) wirkt IL-6 in vivo und in vitro als Differenzierungsfaktor für B-Zellen. Bei vorausgehender Aktivierung durch IL-4 kann IL-6 in B-Zellen die Sekretion von IgG anregen, damit induziert es die abschließende Reifung der B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen. Für T-Zellen wirkt es als Aktivierungsfaktor. Reife und unreife T-Zellen werden in Gegenwart von IL-6 und IL-2 zur Differenzierung in zytotoxische Zellen angeregt. Außerdem spielt IL-6 eine Rolle bei der Entwicklung und Proliferation von Thymozyten und thymusständigen T-Zellen. Auf den Knochenstoffwechsel bezogen kann IL-6 die Osteoklastogenese beeinflussen [Ohsaki et al. 1992], wobei sich in Verbindung mit IL-3 Kolonien aus Granulozyten und Makrophagen bilden (CFU-GM = „Colony forming units Granulocytes/Macrophages“) aus denen sich wiederum Osteoklastenvorläuferzellen bilden können [Bellido et al. 1995; Kurihara et al. 1990]. Osteoklasten besitzen IL-6 Rezeptoren, welche bei Aktivierung die klastische Aktivität verstärken können. In Kombination mit seinem löslichen Rezeptor kann IL-6 auch Osteoklasten stimulieren [Suda et al. 1995]. Zusammen mit IL-1, welches die IL-6 Produktion steigend mitreguliert, unterstützt IL-6 demnach den Knochenabbau durch verstärkte Proliferation der Osteoklasten [Jilka et al. 1992, Black et al. 1987-1992].

1.6.3 Interferon- γ (IFN- γ)

Durch Antigene, Mitogene oder Allogene kommt es zur Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen, welche dadurch zur Synthetisierung von IFN- γ angeregt werden. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Lymphozyten sind in der Lage IFN- γ zu bilden. Die Rezeptoren für IFN- γ finden sich mit Ausnahme von Erythrozyten auf allen bisher

getesteten humanen Zelllinien. Nach der Bindung von IFN- γ kommt es zur Internalisierung des Rezeptorkomplexes durch Endozytose. Natürliche und transformierte Zellen werden durch IFN- γ antimitotisch und antiproliferativ beeinflusst. IFN- γ zeigt hier sowohl antivirale als auch antiparasitäre Aktivität. Hauptsächlich hat IFN- γ jedoch eine immunmodulatorische Wirkung. IL-1, IFN- γ und IL-2 wirken synergistisch, weiterhin ist IFN- γ für die Ausbildung von IL-2-Rezeptoren auf T-Zellen wichtig. Durch IL-2-Aktivierung von T-Zellen wird die Synthese von IFN- γ und anderen Zytokinen angeregt. Die IL-4 induzierte Proliferation von B-Zellen wird durch IFN- γ inhibiert, zusammen mit Anti-Ig aber wird die Proliferation von B-Zellen costimuliert. Für die Ausbildung des Zelloberflächenproteins CD4 in T-Helferzellen ist IFN- γ ebenfalls verantwortlich und induziert in Monozyten und Makrophagen die Sekretion von TNF- α , sowie die Transkription von verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie z.B. GM-CSF. Speziani et al. schreiben IFN- γ in einer aktuellen Studie eine inhibitorische Wirkung auf die Osteoklastendifferenzierung zu [Speziani et al. 2007].

1.6.4 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

Alle somatischen Zellen, außer Erythrozyten, exprimieren einen spezifischen Rezeptor, über den TNF- α seine Wirkung vermitteln kann. TNF- α und IL-1 werden von Makrophagen, T-Zellen, und NK-Zellen nach Stimulation durch Lipopolysaccharide zusammen mit anderen Monokinen sezerniert. CD8⁺-Zellen sezernieren wenig oder kein TNF- α , CD4⁺-Zellen dagegen schon. Jedoch sind auch stimulierte Neutrophile in der Lage TNF- α zu produzieren. Eine Reihe von Modulatoren kann die Produktion von TNF- α beeinflussen. Eine Steigerung wird z.B. durch IL-2, GM-CSF aber auch IFN angeregt. IL-6 hingegen kann die Bildung inhibieren. TNF- α ist für die normale Immunantwort notwendig. Die Stimulation der Ausbildung von Differenzierungsantigenen auf Zellmembranen aller Leukozyten und Lymphozyten wird durch TNF- α angeregt und die Produktion von koloniestimulierenden Faktoren und IFN- γ beeinflusst. Es kann die schon induzierte Proliferation von T-Zellen verstärken und ist als membrangebundene Form für die Zell-zu-Zell vermittelte Abtötung, von z.B. virusinfizierten Zellen, mitverantwortlich. Neutrophile Zellen werden in ihrer

zytotoxischen und phagozytotischen Wirkung verstärkt, z.B. durch bessere Adhärenz. TNF- α kann Osteoklasten für die Knochenresorption aktivieren [Johnson et al. 1989] und so Knochenneubildung unterdrücken [Bertolini et al. 1986]. Für Fibroblasten wirkt es als Wachstumsfaktor und unterstützt die Kollagenasesynthese [Bertolini et al. 1986, Canalis 1986]

1.7 Enzyme und Stoffwechselprodukte

1.7.1 Lactat

Durch die Reduktion von Pyruvat entsteht Lactat. Pyruvat wiederum kann auf drei Wegen entstehen:

- durch Transaminierungs- und Dehydrogenierungsreaktionen bei der Protolyse von Aminosäuren
- durch die Oxidation von Lactat durch die Lactatdehydrogenase
- im Embden-Meyerhof-Zyklus im Rahmen der Glykolyse

Ein Überschuss von Lactat kommt dadurch zu Stande, dass diese verschiedenen Systeme, die mitochondriale Pyruvatoxidation durch überschießende Bildung von Pyruvat aushebeln. Weiterhin können durch Verminderung der Sauerstoffversorgung des Gewebes die Leistungsfähigkeit der Mitochondrien vermindert werden, was wiederum auch zur Erhöhung der Lactatkonzentration führt. Die dadurch zunehmende ATP-Verarmung und der Abfall des pH-Wertes hemmen die Glukoneogenese additiv, mit der Folge, dass das Lactat weiter steigt.

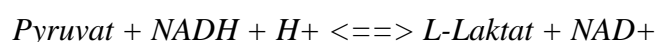
Bei der Beurteilung der Zellkultur kann Lactat, als anaerobes Stoffwechselprodukt der Glykolyse, als Parameter für „Stress“ dienen, zum Beispiel als Hinweis auf Probleme in der Gas- und Sauerstoffversorgung der Kultur [Thomas 1992].

1.7.2 Lactat-Dehydrogenase (LDH)

Die Gesamt-LDH ist Bestandteil aller Gewebe und setzt sich aus fünf Isoenzymen LDH 1-5 zusammen. Sie ist ein zytoplasmatisches Enzym und kommt damit in den Geweben etwa 500fach konzentrierter vor als im Plasma. Jegliche Zellzerstörung führt so zu einer Zunahme der extrazellulären LDH-Konzentration und LDH-Aktivität im Serum. Die LDH ist daher kein Leitenzym zur Bestimmung eines bestimmten Organschadens, kann aber schon zum Nachweis eines geringen Zelluntergangs herangezogen werden.

Für die Zellkultur kann sie ebenfalls als Marker des Zelluntergangs verwendet werden, da die LDH bei der Zerstörung von Zellmembranen unweigerlich in das Kulturmedium abgegeben wird. Die Resistenz der LDH gegen mögliche vorhandene Proteasen erleichtert dabei die quantitative Bestimmung.

Als NAD⁺ Oxidoreduktase katalysiert die LDH die Oxidation von Lactat zur Pyruvat unter Verwendung von NAD⁺ als H⁺-Akzeptor. Die Geschwindigkeit der NADH-Bildung ist direkt proportional der katalytischen LDH-Aktivität und wird durch die Bestimmung der Extinktionszunahme bei 340nm gemessen [Thomas 1992]



1.7.3 Alkalische Phosphatase (AP)

Das Enzym „alkalische Phosphatase“ ist kein Einzelenzym. Die alkalische Phosphatase lässt sich als Summe der Gesamtaktivität verschiedener Enzymunterformen im Serum oder Plasma nachweisen. Die verschiedenen Isoenzymformen entstammen unterschiedlicher Gewebe, wie dem Darm, der Plazenta, der Leber, dem Knochen, den Nieren und postgenetischen Formen, wie der alkalischen Gallengang-Phosphatase und den Tumor-Phosphatasen. Bei der Zellkultur kann die alkalische Phosphatase als Osteoblastenaktivitätsmarker verwendet werden. Die Osteoblasten verursachen beim

Versuch Knochenmasse aufzubauen eine Erhöhung der Knochen-AP und bilden, wenn sie sich im Differenzierungsstadium befinden [Aubin et al. 1995], vermehrt membrangebundene alkalische Phosphatase.

2 Fragestellung

2.1 Problemstellung

Als Standard für Rekonstruktionen ossärer Knochenverluste gilt in der orthopädischen Chirurgie und Traumatologie die autologe Knochentransplantation, da die natürlichen osteogenen Eigenschaften des Transplantates erhalten bleiben [Burchart 1996]

Jedoch zeigten Patienten nach einer autologen Knochenspenden mit notwendigem Eingriff am Beckenkamm eine erhöhte postoperative Schmerzsymptomatik, sowie eine erhöhte Morbidität [Greenwald et al. 2001].

Art und Ausdehnung des zu überbrückendem Substanzdefekts setzen der autologen Knochentransplantation jedoch enge Grenzen und so kommt der allogenen Knochentransplantation eine herausragende Stellung in der orthopädischen Chirurgie und Traumatologie zu, beispielsweise bei großen Prothesenwechseloperationen, Rekonstruktionen nach Knochentumorresektionen oder ausgedehnten Knochendefekten. In den USA, dem Land mit den weltweiten meisten Knochentransplantationen, beläuft sich die Zahl der verwendeten allogenen Knochentransplantate auf bis zu 800.000 pro Jahr. In Deutschland werden jährlich zurzeit ca. 75.000 autologe und 25.000 allogene Knochentransplantationen durchgeführt. [Center for Disease Control and Prevention 2002, Jerosch et al. 1990, von Garrel 2003].

Desweiteren stehen weitere Materialien, wie künstliche Knochenersatzstoffe, bovines Knochenmaterial und vitale Knorpel- bzw. Knochenzellkulturen (Tissue engineering), zur Verfügung.

Unter diesen Alternativen zum autologen Knochenersatz, nimmt das allogene Knochentransplantat eine Sonderstellung ein, da der wesentliche Vorteil in seiner Fähigkeit liegt osteokonduktiv und teilweise osteoinduktiv zu wirken.

Jedoch wirft auch das allogene Knochentransplantat einige Probleme auf.

Allogene Knochentransplantate benötigen eine standardisierte Logistik, die bestimmte Konservierungstechniken, Spender-Screening-Verfahren und Sterilisationsmethoden voraussetzt. Beschriebene Komplikationen, wie bakterielle Kontamination von Transplantaten oder die Virusübertragung von HIV durch Knochentransplantate [Schratt et al. 1996] können so verhindert werden.

Um eine ausreichende Sterilisation der allogenen Knochentransplantate zu erreichen hielten die verschiedensten Verfahren Einzug in den klinischen Alltag [Knaepler et al. 1994]. Jedoch wirken sich die verschiedenen Verfahren sehr unterschiedlich auf die Transplantateigenschaften aus [Godette et al. 1996, Knaepler et al. 1991, Shin et al. 2005]. Als angewandte Verfahren seien die physikalische Sterilisation durch Gammabestrahlung, chemische Behandlung mit PES/Ethanol, Tutoplast®- oder Wärmeverfahren, wie das Autoklavieren, genannt.

Eine maximale Keim- und Virusinaktivierung scheint mit jedem dieser Verfahren erreicht [Bright 1987, von Versen et al. 1992, Wutzler et al. 2000; Hofmann et al. 1996].

Es existieren jedoch nur wenige Studien in der aktuellen Literatur, die Information über die Biokompatibilität der behandelten allogenen Knochentransplantate im Empfängerorganismus geben.

Eine mögliche immunologische Reaktionen die im Empfänger durch das behandelte allogene Knochentransplantat ausgelöst wird, lässt sich nur sehr schwierig im Tierexperiment darstellen und auf die *in vivo* Situation im Menschen übertragen.

Um diese Problematik des Tierversuchs zu umgehen, versucht man mittels Zellkulturen die physiologischen Vorgänge *in vitro* abzubilden. Jedoch sind gerade die Abläufe beim Einheilen des Knochentransplantats sehr komplex und nicht auf einen Zelltyp zurückzuführen. Verschiedenste Zelltypen haben dabei Einfluss auf die Immunmodulation am und im allogenen Knochentransplantat und werden wiederum unterschiedlich durch die Biokompatibilität des behandelten Knochentransplantats beeinflusst.

Unserer Arbeitsgruppe entschied sich aufgrund der Komplexität der Zellzusammenhänge gegen ein Zellkulturmodell von Zelllinien oder Monozellkulturen.

Diese Testmodelle sind zwar in der Lage *in vitro* Zellfunktionen unter kontrollierten Bedingungen nachzuweisen. Jedoch sehen wir einen großen Nachteil bei der *in vitro* Darstellung der Immunmodulation, d.h. in unserem Versuchsansatz des Zytokinprofils und der Zelldifferenzierung.

Um diese Zusammenhänge möglichst exakt abzubilden wurde zur Testung der beiden Sterilisationsverfahren die humane Knochenmarkszellkultur verwendet.

Die humanen Knochenmarkszellen haben zum einen *in vivo* einen unmittelbaren Kontakt mit dem behandelten, transplantierten, allogenen Knochentransplantat. Zum

anderen ermöglicht die Inhomogenität des Zellpools der humanen Knochenmarkszellkultur eine Zelldifferenzierung.

Durch die verschiedenen pluripotenten Vorläuferzellen kann sich die Kultur auch unter *in vitro* Bedingungen in verschiedene Zellen, z.B. osteoblasten-, osteoklastenähnliche oder immunologische, differenzieren [Wilke et al. 1995]. Unterschiede hinsichtlich des Zytokinprofils und der Zelldifferenzierung im Vergleich zwischen Kontrollen und den mit verschiedensten Biomaterialien versetzten Kulturen konnten in verschiedenen Studien durch die humane Knochenmarkszellkultur mehrfach sensitiv bewiesen werden [Wilke A. et al. 1992-2005].

2.2 Zielsetzung der Arbeit

In der aktuellen Literatur finden sich nur wenige Studien über die Biokompatibilität allogener Knochentransplantate, die einem standardisierten Sterilisationsverfahren unterzogen worden.

Ziel dieser Studie ist es experimentell *in vitro* Veränderungen und Einfluss von gängigen Sterilisationsverfahren auf die Immunmodulation von humanen Knochenmarkszellkulturen nachzuweisen und dadurch Rückschlüsse auf die Biokompatibilität der behandelten allogenen Knochentransplantate und *in vivo* Zusammenhänge zu gewinnen:

- Können Aussagen über die Vitalität der humanen Knochenmarkszellen nach Exposition mit dem behandelten allogenen Knochen durch Bestimmung von Lactat, Lactatdehydrogenase (LDH) und Trypanblauauszählung gemacht werden?
- Zeigen sich signifikante Unterschiede in den verschiedenen Kulturen im Hinblick auf die Expression des Knochenstoffwechsel beeinflussender Zytokine (IL-1 β , IL-6, INF- γ und TNF- α)?
- Kann eine Osteoblastentätigkeit (alkalische Phosphatase (AP)) nachgewiesen werden?
- Kommt es zu Veränderungen der Gesamtpopulation an CD 45⁺ Lymphozyten in den verschiedenen Kulturen und können mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen (FACS – Analysen) signifikante Unterschiede bestimmt werden?
- Ist das benutzte Zellkultursystem hinreichend sensitiv, um eine Aussage über die Bioverträglichkeit der behandelten Knochenproben machen zu können?
- Muß der vorliegende Studienaufbau verbessert werden?

3 Material und Methoden

3.1 Gewinnung der Femurköpfe

Die für das Studiendesign benötigten Femurköpfe wurden allesamt anlässlich endoprothetischer Hüftoperationen entnommen (Ethikkommission des Fachbereiches Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg genehmigt: AZ 66/03). Die potentiellen Spender wurden über die weiteren Verwendungen ihres Knochens aufgeklärt und gaben hierzu ihr schriftliches Einverständnis anhand eines Formblattes (siehe Anhang). Weiterhin mussten die Spender sich mit unten genannter serologischer Untersuchung schriftlich einverstanden erklären. Außerdem wurde eine Anamneseerhebung nach den Richtlinien zum Führen einer Knochenbank durchgeführt. Gemäß diesen Richtlinien wurden serologische Untersuchungen auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper veranlasst:

- Anti-HIV I und II Antikörper
- Anti-HCV Antikörper
- Anti-HBc Antikörper
- HBs-Antigen
- Antikörper gegen *Treponema pallidum*

Der Anamnesebogen wurde ebenfalls zur Evaluierung auf das Vorliegen einer Knochenstoffwechsel beeinflussenden Krankheit erhoben. Damit stellte die zur endoprothetischen Hüftoperation führende Coxarthrose die einzig relevante Vorerkrankung dar.

Nach der Resektion des Hüftkopfes wurde der gewonnene Femurkopf in einen sterilen Transplantatbehälter eingelegt und das Behältnis verschlossen. Um eine nach Knochenbankbedingungen geltende Kryokonservierung zu gewährleisten, verbrachte man das Behältnis umgehend in einen Tiefkühlfroster der Knochenbank mit einer Mindesttemperatur von -70°C .

Ein Probendokumentationsbogen wurde mit den Kenndaten des Knochenspenders und den Ergebnissen der serologischen Untersuchung angelegt und der Femurkopf für die experimentelle Weiterverarbeitung freigegeben.

3.2 Herstellung der Knochentransplantate

3.2.1 Zuschneiden der Hüftköpfe

Die bei -70°C ordnungsgemäß gelagerten Hüftköpfe wurden nacheinander bei Zimmertemperatur schonend aufgetaut, um dann in 3mm starke Scheiben geschnitten werden zu können. Hierzu wurde ein Trennschleifsystem der Firma EXAKT mit einem diamantbeschichtetem Sägeblatt der Körnung D64 mit einer Stärke von 0,2mm verwendet. Der dadurch entstehende Sägeverlust floß mit $350\mu\text{m}$ in die weitere Berechnung des Schneideverfahrens ein. Der Hüftkopf wurde mit Hilfe einer Greifklemme am Vorrückzylinder des Schlittens befestigt, um jegliche Wackelbewegung des Knochentransplantates zu unterbinden. Diese Befestigung ermöglichte weiterhin die beliebige Ausrichtung des Hüftkopfes zum Diamantsägeblatt und die Herstellung von Knochenscheiben mit einer Planparallelität von $\pm 2\mu\text{m}$. Die Gewichte am Schlittensystem ermöglichten einen stetigen Schneideablauf unter gleich bleibendem Zug am Transplantat, um ein Verkanten oder Schlingern des Diamantsägeblattes zu unterbinden. Die Stärke von 3mm der zu gewinnenden Hüftkopfscheiben wurde mit Hilfe der Millimeterschraube am Vorrückzylinder des Schlittensystems vorgegeben, jedoch wurde nach jedem Schneidevorgang die gesägte Scheibe kontrolliert und das System bei Bedarf nachjustiert. Die Kühlung des Sägeblattes und der Knochenprobe wurde mit steriler 0,9% NaCl-Lösung ($4-6^{\circ}\text{C}$) gewährleistet, um einen Schaden durch die sich beim Schneiden bzw. Bohren entwickelnde Hitze und eine Austrocknung zu verhindern. Die gesägte Spongiosaplatte wurde bis zur weiteren Verarbeitung und um eine Austrocknung zu verhindern in einer Petrischale mit einer phosphat-gepuffertem Kochsalzlösung (PBS) zwischengelagert.

Die geschnittene und von Kortikalis umrandete Spongiosaplatte (Stärke 3mm) konnte nun zur Spongiosazylinderherstellung weitergeleitet werden.

3.2.2 Bohren der Spongiosazyylinder

Aus den gesägten Spongiosaplatten wurden Spongiosazyylinder ausgebohrt. Der dazu verwendete diamantbeschichtete, speziell angefertigte Hohlbohrer hatte einen Durchmesser von 10mm und wurde von einem Bohrmaschinengerät (Fa. Proxxon PF 360) angetrieben. Der Bohrtisch war mit einer speziellen Haltevorrichtung für die Spongiosaplatten ausgerüstet, um ein Verrutschen der Spongiosaplatte zu verhindern. Während des Bohrvorganges wurde darauf geachtet, dass weder Knochenzysten, sklerotische Knochenanteile oder Kortikalis in den Bohrdurchmesser gerieten. Die Bohrrichtung wurde durch die Aufhängung der Bohrmaschine, also in 90° zum Bohrtisch, vorgegeben. Eine Kühlung des Diamanthohlbohrers, des Sägeblattes und der Knochenprobe wurde mit steriler 0,9% NaCl-Lösung (4-6°C) gewährleistet, um einen Schaden durch die sich beim Bohren entwickelnde Hitze und eine Austrocknung zu verhindern. Die durch das Ausbohren der Spongiosaplatte gewonnen reinen Spongiosazyylinder wurden daraufhin mit einem speziellen Stößel (Probenextraktor) aus dem Diamanthohlbohrer entfernt (Abb.3-1).

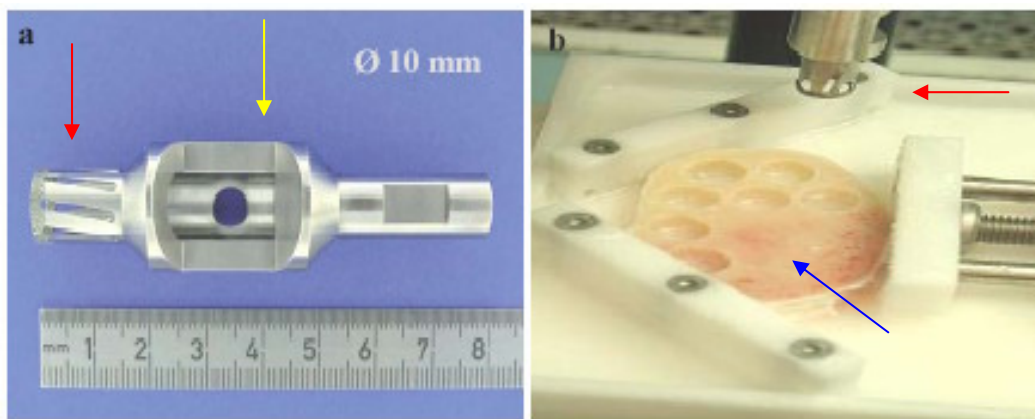


Abbildung 3-1 a) Diamanthohlbohrer b) Ausbohren der Spongiosazyylinder

roter Pfeil: diamantbeschichtete Spitze des Hohlbohrers
 gelber Pfeil: Entnahmestelle der Spongiosazyylinder
 blauer Pfeil: Spongiosaplatte mit Zylinderlöchern nach Hohlbohrung

3.2.3 Messen der Spongiosascheiben

Um ein möglichst standardisiertes Spongiosavolumen zu haben, wurde die Stärke aller gebohrter Spongiasazylinder mittels Millimetermesser nachgeprüft. Das Kriterium „spongiöse Knochenzylinder, Stärke von $\geq 2,77\text{mm} \leq 3,00\text{mm}$, Durchmessers 10mm“ wurde festgesetzt. Jeglicher Spongiasazylinder mit einer Stärke kleiner oder größer dieser Bandbreite wurde für den Test nicht weiter zugelassen und gemäß der bestehenden Richtlinien verworfen. Die Spongiasazylinder wurden anschließend je 3-mal 10min in Earle's Salt Solution (Biochrom AG, Berlin) und 1-mal für 20min in Earle's Salt Solution (versetzt mit 500IE Streptomycin/Penicillin, 4µg Amphotericin B und 10µg Gentamycin) gewaschen und in einem Plastikröhrchen mit den Kenndaten des Patienten bei -70°C kryokonserviert

3.2.4 Entfettung der Spongiasazylinder

Die Spongiosaplättchen wurden vor dem eigentlichen Sterilisationsverfahren entfettet. Dieses wurde durch zweimaliges Waschen in Aceton á 1,5 Stunden erreicht. Im Anschluss wurden verbleibende Rückstände durch mehrfaches Spülen mit Aqua dest. entfernt. Zuletzt wurden die Spongiosaplättchen mit Pressluft bei 5 Bar aus und trocken geblasen, um letzte Fragmente zu entfernen. Die Zuführung zum jeweiligen Sterilisationsverfahren erfolgte hierauf im entsprechenden Behälter.

3.3 Knochensterilisationsverfahren

3.3.1 Gammabestrahlung 25 kGy

Durch die energiereiche Gamma-Bestrahlung, die beim Zerfall von radioaktiven Elementen entsteht, in unserem Fall Cobalt-60, können auf dem Knochen befindliche Keime zerstört werden. Angriffspunkte des Verfahrens liegen zum einen darin die Zellkerne des Erregers direkt zu treffen, also eine spätere Replikation durch Schädigung

der genetischer Information zu unterbinden, zum anderen durch die sekundäre Bildung freier Radikale zellzerstörerisch zu wirken [Galea und Kearney 2005].

Die Gamma-Anlage (Cobalt-60) hat aufgrund der Quellenbeladung, des Produktweges und der Fördereinrichtung ein bestimmtes Strahlenfeld und somit eine anlagenspezifische Dosisverteilung, die über dosimetrische Messungen erfasst wird und die maximalen und minimalen Dosisbereiche festlegt (Abb.3-3).

Durch mehrmaliges Umfahren der Quellenanlage wird die gewünschte Dosis auf dem zu bestrahlendem Material erreicht. Die laut Verfahren verpackten Knochenprobenkörper wurden von der Firma Beta-Gamma-Service in Wiehl (BGS) mit 25kGy bestrahlt.

Um die Proben in den kontinuierlichen Betrieb der Anlage eingliedern zu können, wurden sie auf einer Europalette (120 cm x 80 cm) an einer Halterung festgemacht und nach den Arbeitsvorschriften der Firma Beta-Gamma-Service weiterbehandelt. Alle Knochenproben wurden gemeinsam auf oben genannter Europalette dem Produktweg zugeführt (Abb.3-2), durchliefen alle Bestrahlungspositionen gleichzeitig und verließen die Gammaanlage steril mit einer erhaltenden Dosis von 25kGy.

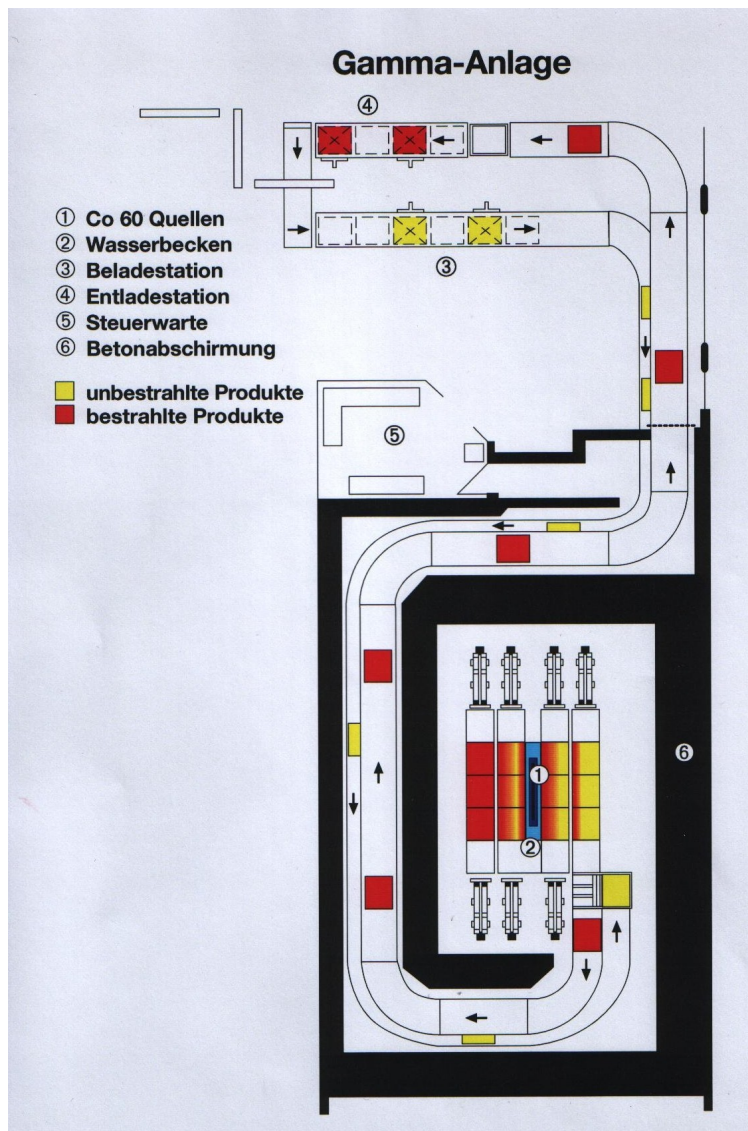


Abbildung 3-2 Die Gamma-Anlage – Darstellung des Produktweges

Quelle: Beta-Gamma-Service GmbH & Co. KG

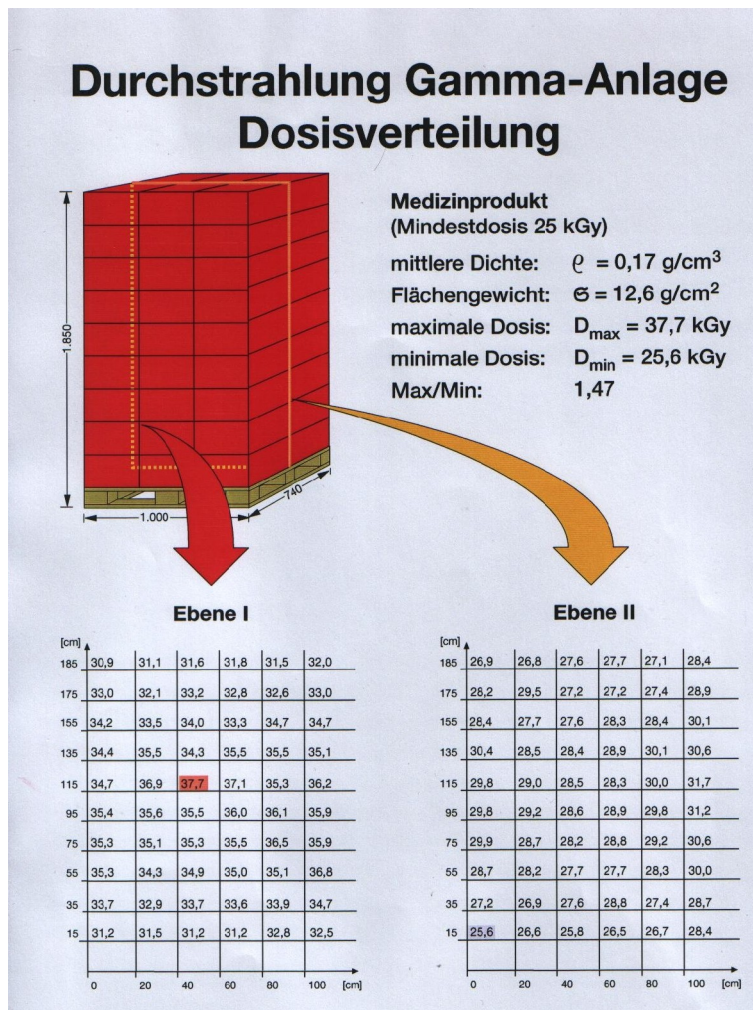


Abbildung 3-3 Dosisverteilung

Nach dem Sterilisationsprozess hat der Hersteller durch geeignete Prüfungen nachzuweisen, dass das sterilisierte Produkt das geforderte Eigenschaftsprofil erfüllt.

Die dosimetrische Validierung dokumentiert, wo bei vorgegebener Anordnung des Produkts in der Verpackung und den gewählten Bestrahlungsbedingungen die Dosisminima und Dosismaxima auftreten

Quelle: Beta-Gamma-Service GmbH & Co. KG

3.3.2 Autoklavieren 121°C

Bei der Dampfsterilisation ist die feuchte Hitze der keimtötende Faktor. Da Wasser jedoch schon bei Erreichen der Siedetemperatur Wasserdampf bildet, ist es notwendig mit erhöhten Drücken zu arbeiten. Dadurch können Sterilisierungstemperaturen, wie z.B. 121°C erreicht werden. Während der Sterilisation bildet sich auf der Oberfläche des Sterilisiergutes Dampfcondensat, dessen Energie an das zu sterilisierende Material (hier

Knochenproben) abgegeben wird. Hierdurch kommt es zur Aufheizung des Sterilgutes und weiterhin zu einer Inaktivierung von Mikroorganismen, sowie zur Koagulation von in den Mikroorganismen vorhandenen Eiweißen und Zerstörung der Zellen [Gesellschaft für Zentralsterilisation von Medizinprodukten 2005].

Die verpackten Knochenproben wurden gemeinsam dem Autoklaven zugeführt und durchliefen den Ablauf der Dampfsterilisation. Die Sterilisationstemperatur von 121°C wurde für alle Knochenproben erreicht.

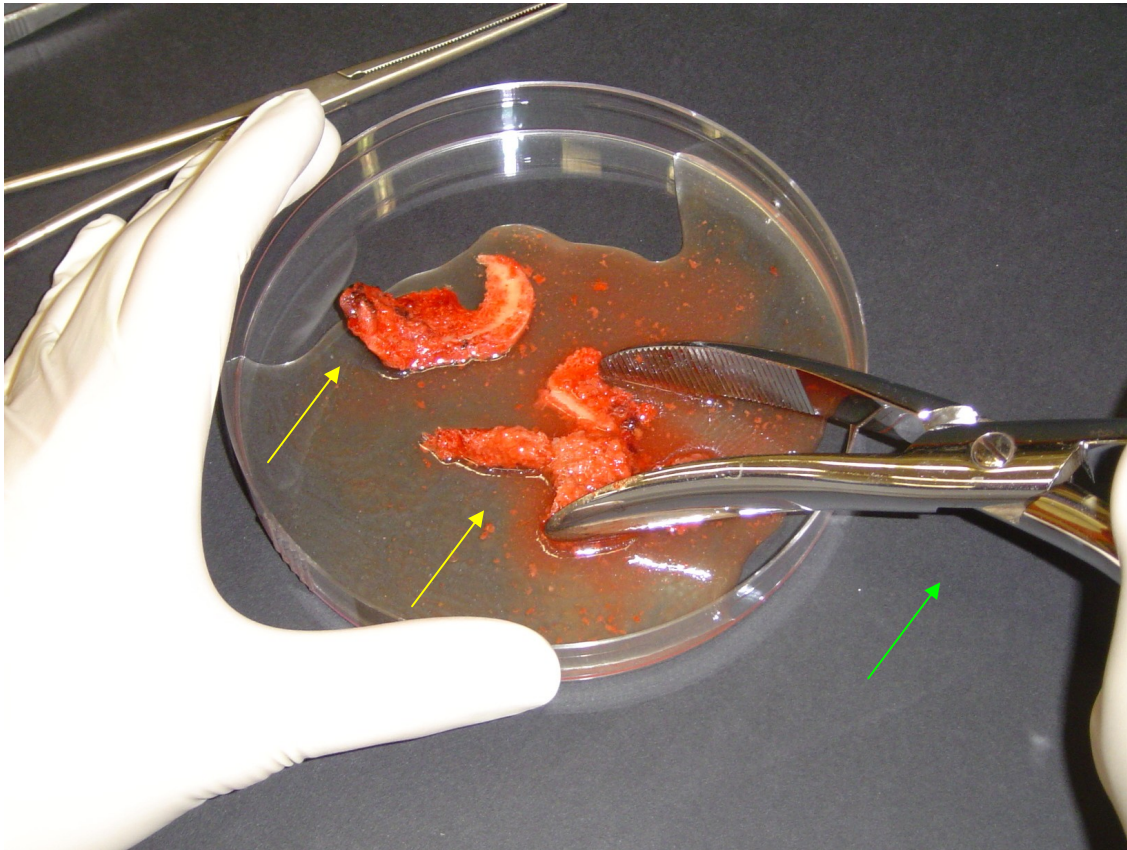
3.4 Knochenmarkspräparation und Zellgewinnung

Die benötigten Zellen wurden im Rahmen von endoprothetischen Hüftoperationen gewonnen. Die Spender der Knochenspongiosa wurden im Sinne der Knochenspende aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis anhand eines Formblattes (siehe Anhang) (Ethikkommission des Fachbereiches Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg genehmigt: AZ 66/03). Es wurde nach den Richtlinien zum Führen einer Knochenbank eine Anamnese und serologische Untersuchung durchgeführt. Dies umfasste Untersuchungen auf Anti-HIV I und II-Antikörper, Anti-HCV Antikörper, Anti-HBc Antikörper, HBs-Antigen, Antikörper gegen *Treponema pallidum* und eine Evaluierung im Anamnesebogen auf den Knochenstoffwechsel beeinflussende Krankheiten. Dadurch wurde sichergestellt, dass die hüftendoprothetische Operation notwendig machende Coxarthrose die einzige relevante Vorerkrankung des Patienten darstellte.

Die Wahl der Zellgewinnung aus Spongiosa aus einer hüftendoprothetischen Operation wurde aufgrund deren Vorteils gegenüber der Sternalpunktionaspiration getroffen [Kalla et al. 1991-92, Wilke et al. 1991-2005]. Die höhere absolute Zellzahl bei gleicher Zusammensetzung der Zellpopulation stellte für unser Versuchdesign, mit den dafür benötigten hohen Zellzahlen, den Hauptvorteil da. Im Verlauf der Operation wurde nach der Femurkopffosteotomie ein Block Knochenmark aus dem proximalen Femurschaft entnommen. Dieser steril entnommene, spongiöse, markhaltige Block (Masse etwa 8x10x20mm) stellte die Grundlage der weiteren Zellgewinnung dar.

Die weitere Überführung in ein steriles Gefäß und die Aufbewahrung in einem flüssigen Phosphatpuffer (0,2% Liquemin Fa. Hoffmann – La Roche, PBS pH 7,4 Fa. Biochrom

AG), um Austrocknung und Blutgerinnung entgegen zu wirken, schloss sich an die intraoperative Entnahme des Spongiosablocks an. Daraufhin konnte unter einer Sterilwerkbank (Vertikal Laminar Flow UV 1800) die Zerkleinerung der Spongiosa mittels steriler Schnabelzange und Zugabe von PBS durchgeführt werden (Abb.3-4).



*Abbildung 3-4 Zerkleinerung der Spongiosa mittels Schnabelzange
gelbe Pfeile: humane Knochenmarksspongiosa
grüner Pfeil: Schnabelzange*

Durch die Aufschwemmung der spongiösen Bestandteile und deren Abtrennung durch ein Knochensieb mit einer Maschenweite von 0,1mm konnte eine Zellsuspension von 170ml gewonnen werden. In 20 kleine Zentrifugenröhrchen (Volumen 20ml) wurde nun ein Dichtegradient von je 4ml verteilt. Dieser Dichtegradient wurde aus 56ml Ficoll (Fa. Seromed) und 28ml Histopaque (Fa. Sigma) hergestellt. Jedes Röhrchen wurde nun mit 8ml Zellsuspension vorsichtig aufgefüllt, so dass eine scharfe Grenze zwischen Dichtegradient und Zellsuspension entstand (d.h. Verhältnis 2:1, Dichte 1,077). Nach der

Zentrifugation (20 min., 2200rpm, 10°C, ohne Bremse, Ausschwingrotor JS-7.5, Fa. Beckmann, USA, $r_{\max}=142\text{mm}$) der Röhrchen konnte man im Röhrchen eine Interphase (entspricht der weißen Zellreihe) (Abb.3-5) als trübes Band erkennen [Kalla et al. 1991].

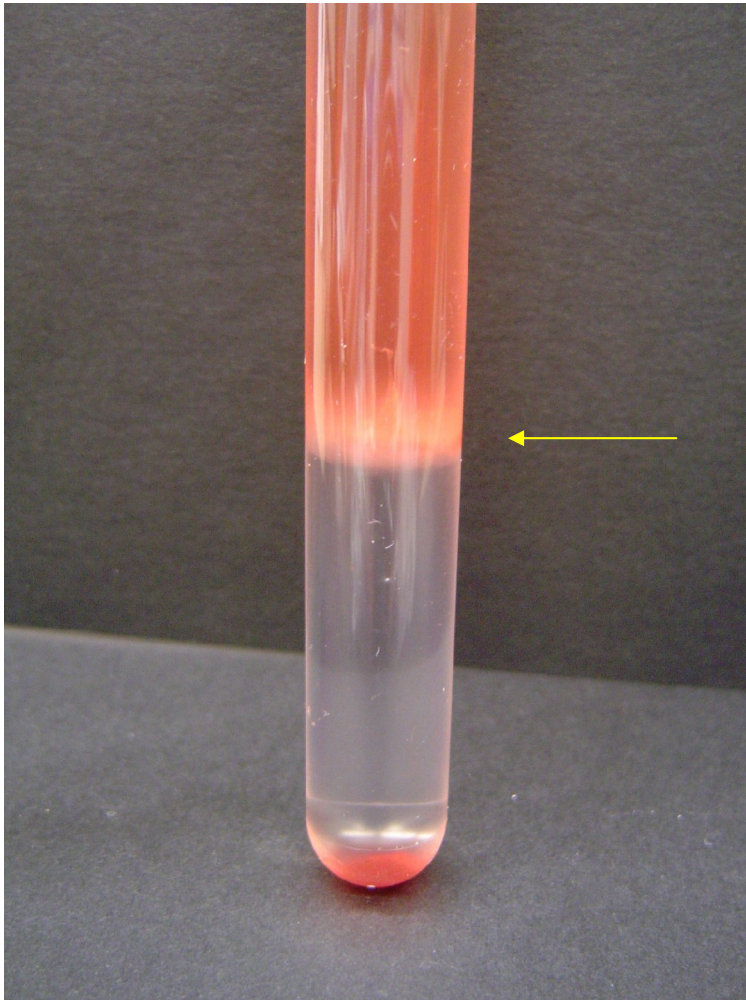


Abbildung 3-5 Darstellung der Interphase im Dichtegradienten nach Zentrifugation der Zellsuspension humaner Knochenmarkszellen

gelber Pfeil: Interphase

Diese wurde entnommen, mit PBS aufgewaschen und wiederum (10 min., 1900 rpm, 10°C, mit Bremse, Ausschwingrotor JS-7.5, Fa. Beckmann, USA, $r_{\max}=142\text{mm}$) zentrifugiert. Unter Verwerfung des Überstandes wurde dieser Waschvorgang dreimal wiederholt, wobei der letzte Waschvorgang in Medium (IMDM) durchgeführt wurde.

Eine Zellzählung wurde im Anschluss mit Hilfe des Casy-Systems (Zellzähler, Fa. Schärfe System GmbH, Reutlingen) durchgeführt.

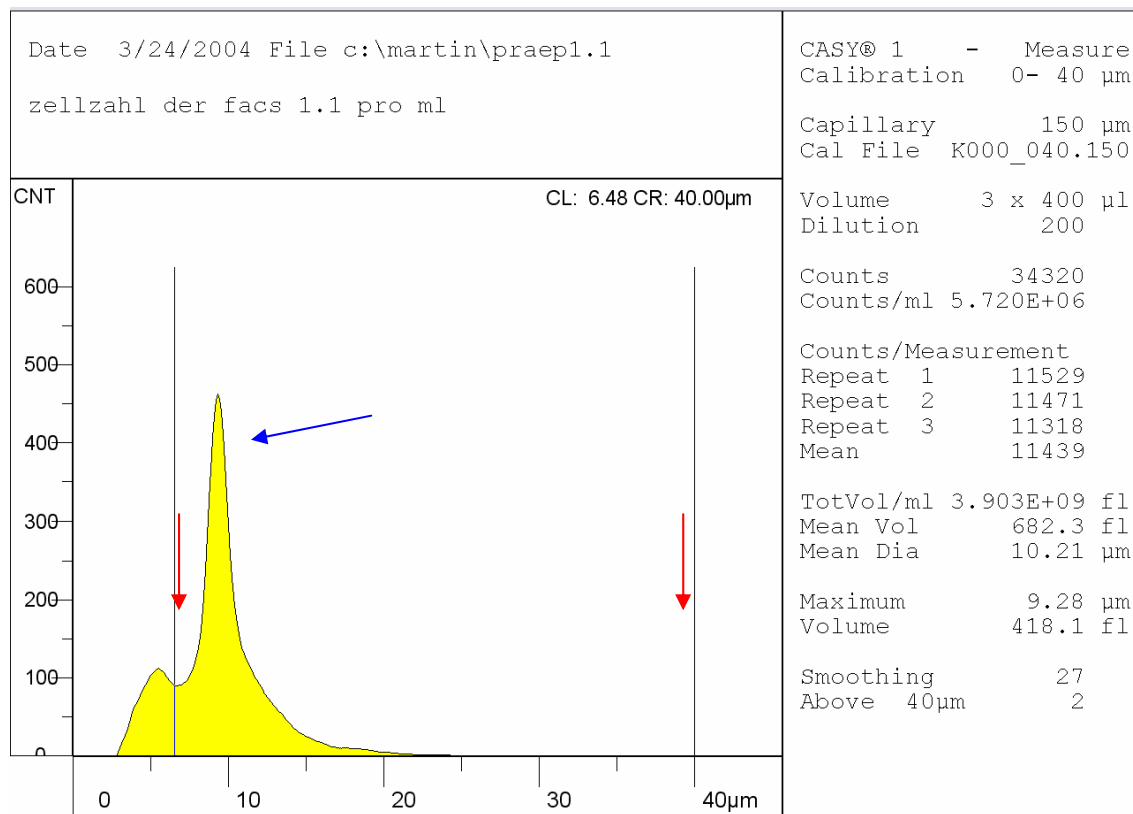


Abbildung 3-6 Darstellung einer humanen Knochenmarkspräparation mittels Zellzähler als CASY-Graph

Um die Zellanzahl für die weitere Kulturplanung berechnen zu können, wurde der Bereich für vitale Zellen von 6,48-40µm (Bereich zwischen den roten Pfeilen) gewählt.

Der Graph zeigt die Anzahl der Signale in counts/ml (y-Achse) aufgetragen in Abhängigkeit von ihrer Größe in µm (x-Achse).

blauer Pfeil: Peak, d.h. die meisten Signale haben eine Größe bei ca. 10µm

3.5 Versuchdesign und Kulturbedingungen des 12-Wochen-Versuchs

Die nach den Kriterien zum Führen einer Knochenbank gesammelten Spongiosaplättchen wurden wie folgt verteilt:

Jedes der beiden Verfahren (Autoklavieren 121°C und Gammastrahlung 25kGy) wurde mit Spongiosaplättchen von jeweils vier verschiedenen Patienten getestet (Abb.3-7). Pro Knochenspender wurden sechs Einzelwells (Bodenfläche 9,81cm²) mit jeweils fünf Spongiosaplättchen bestückt. Auf die mit je fünf Spongiosaplättchen bestückten Einzelwells wurden 3x10⁶ Zellen in 3ml IMDM geschichtet. Weiterhin wurden von der Knochenmarkpräparation als positiv Kontrolle drei Einzelwells mit 3x10⁶ Zellen in 3ml IMDM ausgesät und als negativ Kontrolle ein Einzelwell mit 3ml IMDM befüllt. Dem Ansatzmedium waren stimulierenden Wachstumsfaktoren Interleukin 3 [IL-3] (Calbiochem® Merck, Darmstadt) und Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor [GM-CSF] (Calbiochem® Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 10.0 ng/ml Medium zugesetzt.

Die Zellen wurden 12 Wochen bei 37° C, 12,5% O₂ und 0% N₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel (3 ml/well) erfolgte alle 48 Stunden unter Zugabe von Zellkultur stimulierenden Wachstumsfaktoren Interleukin 3 [IL-3] (Calbiochem® Merck, Darmstadt) und Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor [GM-CSF] (Calbiochem® Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 10.0 ng/ml Medium [Kalla et al. 1991-92, Wilke et al. 1991-2005]. Die Zellkulturen wurden während der 12-wöchigen Dauer des Versuchs auflichtmikroskopisch (Mikroskop Aristomet®, Leitz, FRG) überwacht, um Aussagen über Zelldichte und Anwachsverhalten machen zu können.

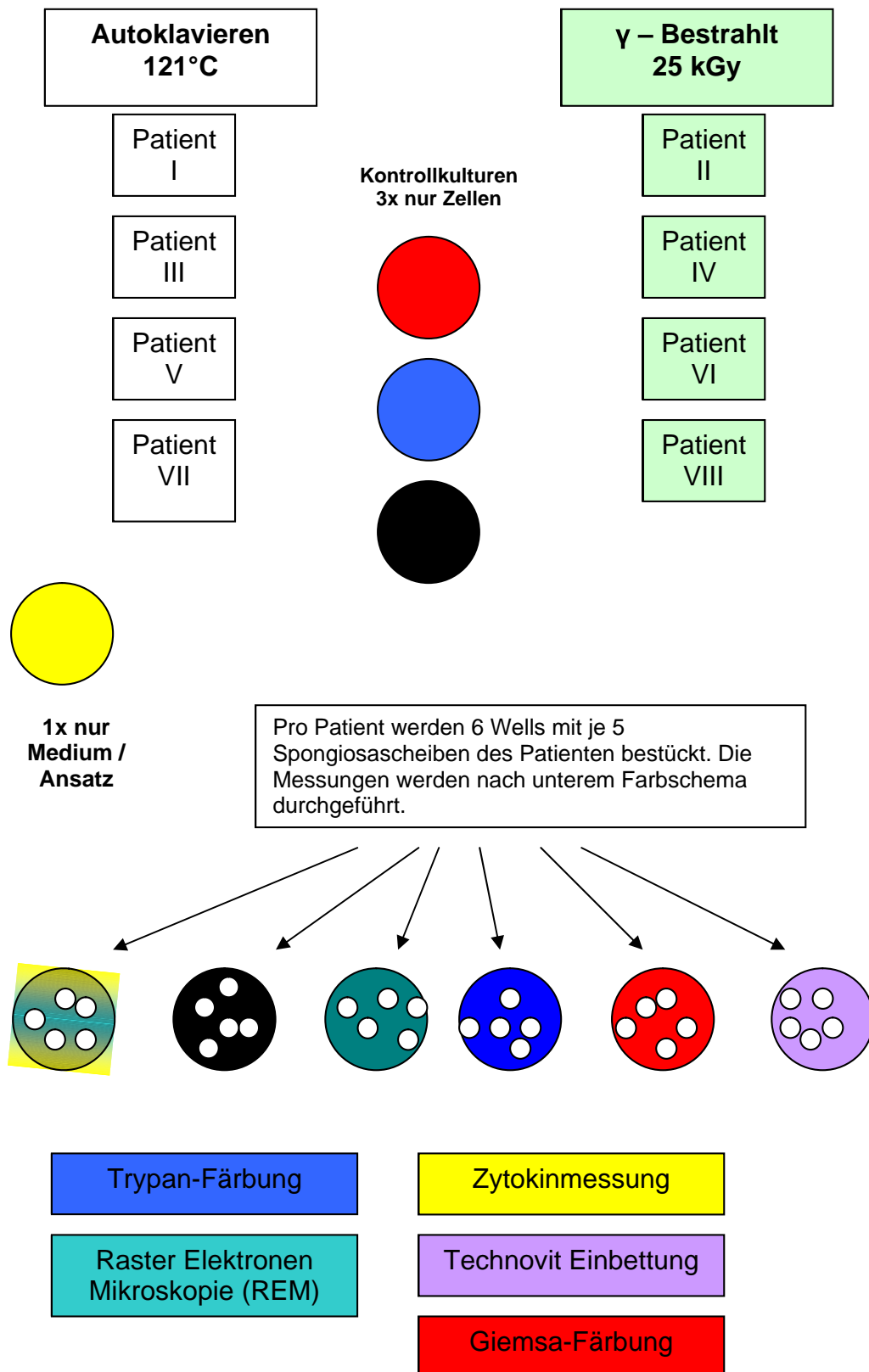


Abbildung 3-7 Darstellung des Versuchdesigns des 12 Wochenversuchs

3.6 Versuchdesign des FACS- Versuchs

Spongiosaplättchen von acht Patienten wurden pro Verfahren evaluiert, um eine statistische Aussage treffen zu können (vier Männer und vier Frauen im Alter von 45-70 Jahren) In einer 6-Lochplatte (Fläche 9,81cm² pro Loch / 5 Zylinder pro Loch) konnten so pro Patient 20 Spongiosaplättchen verteilt werden.

Auf die vier, mit je fünf Spongiosaplättchen bestückten Vertiefungen wurden 3x10⁶ Zellen geschichtet (Abb.3-8).

Dem Ansatzmedium waren stimulierenden Wachstumsfaktoren Interleukin 3 [IL-3] (Calbiochem® Merck, Darmstadt) und Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor [GM-CSF] (Calbiochem® Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 10.0 ng/ml Medium zugesetzt.

Um ebenfalls eine positiv und negativ Kontrolle pro 6-Lochplatte zu haben, wurde Loch 5 mit 3x10⁶ Zellen in 3ml IMDM und Loch 6 mit 3ml IMDM ausgesät bzw. befüllt. Die Zellen wurden vier Wochen bei 37° C, 12,5% O₂ und 0% N₂ kultiviert Ein Mediumwechsel (3 ml/Vertiefung) erfolgte alle 48 Stunden unter Zugabe von zellkulturstimulierenden Wachstumsfaktoren (Interleukin 3 [IL-3] (Calbiochem® Merck, Darmstadt) und Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor [GM-CSF] (Calbiochem® Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 10.0 ng/ml Medium [Kalla et al. 1991-92, Wilke et al. 1991-2005]. Die Zellkulturen wurden während der Dauer des Versuchs auflichtmikroskopisch (Mikroskop Aristomet[®], Leitz, FRG) überwacht. Nach vier Wochen Kulturdauer wurde eine Vitalitätsbestimmung durch eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Weiterhin wurde am Tag der Zellpräparation und nach Kulturdauer von 28 Tagen eine FACS-Analyse mit Oberflächenmolekül typischen Antikörpern durchgeführt.

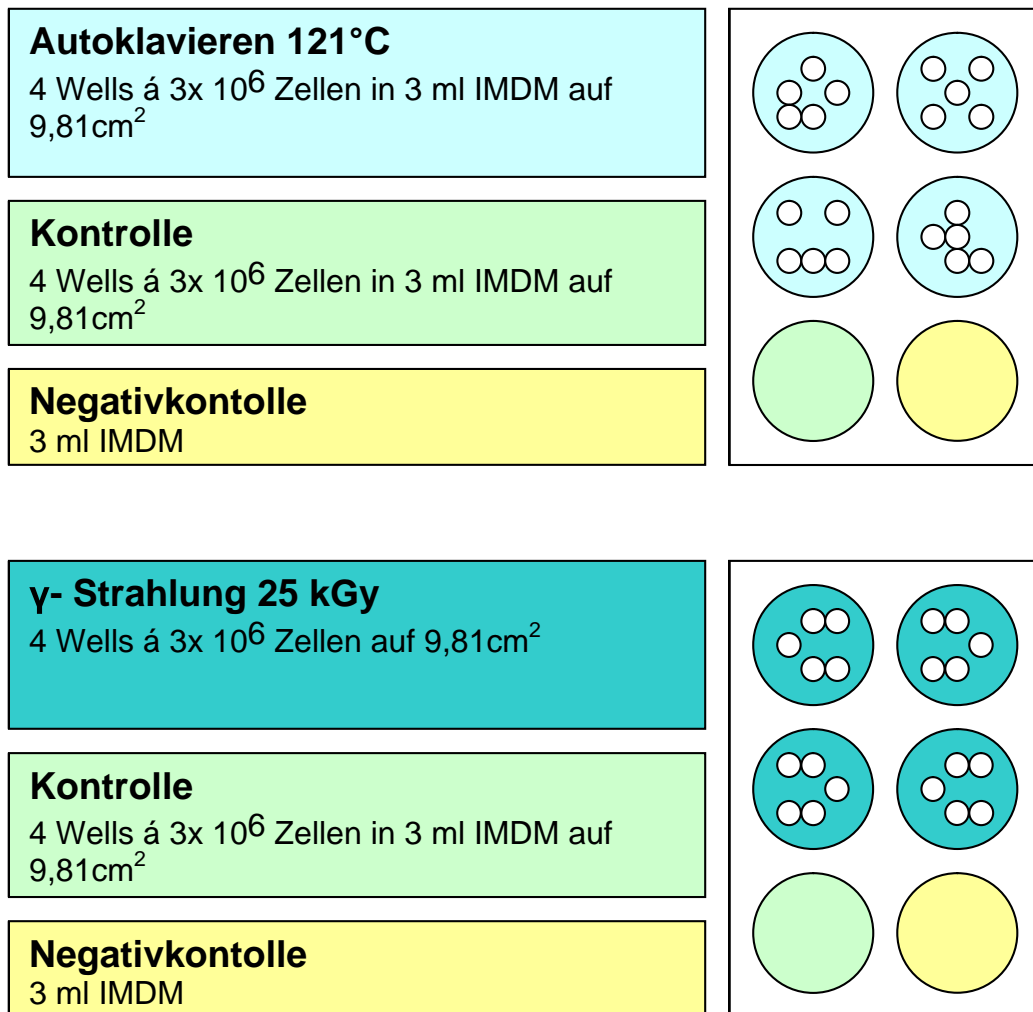


Abbildung 3-8 Darstellung des Versuchdesigns des 4-Wochenversuchs/ FACS-Versuchs

3.7 Probenmanagment

Bei jedem Mediumwechsel wurde der Mediumüberstand (3ml) in sterile Zentrifugenröhrchen abepitert und durch frisches IMDM ersetzt. Die einzelnen Röhrchen wurden daraufhin bei 2200U/min und 10°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Aufnahme von 2ml des Mediumüberstandes in sterile Eppendorf Tubes, wurden diese mit den Kenndaten der Probe beschriftet und die so gesammelten Proben des Mediumwechsels bei -80°C kryokonserviert.

Die Weiterverarbeitung der Probenkörper sah nun eine pH-Bestimmung vor, diese wurde aus dem Restmediumüberstand (1ml) in den Zentrifugenröhrchen digital (Digital-pH-Meter 646, Fa. Knick) bestimmt und in den Verlaufsdaten der einzelnen Zellkulturen dokumentiert.

3.8 Zellkultur-Medium

IMDM = Iscove`s modified Dulbecco`s Medium (Fa. Life Technologies, Paisley Scotland) [Kalla et al. 1991]

Zusammensetzung für 500ml IMDM:

- 370ml Aqua dest.
- 65ml fetales Kälberserum (fetal calf serum, Fa. Boehringer Mannheim) hitzeinaktiviert, 30 Minuten bei 60° Celsius
- 65ml Pferdeserum (horse serum, Fa. PAA Linz, Österreich) hitzeinaktiviert, 30 Minuten bei 60° Celsius
- 0,5ml Hydrocortison (Fa. Sigma Diagnostic, St. Louis, USA) einer 5mMolaren Stammlösung (2,4ng/ml)
- 50ng/ml Certomycin (Fa. Essex Pharma, München),
- 8,85g ISCOVE`s (Fa. Life Technologies, Paisley Scotland)
- 30ml NaHCO₃ 5% (Fa. Merck, Darmstadt)
- 5ml L-Glutamin (Fa. PAA Linz, Österreich) (292,3ng/ml)

Das angesetzte Medium wurde unter einer Sterilwerkbank (Vertikal Laminar Flow UV 1800) steril filtriert (Filter 0,45µm und 0,22µm) und in Mediumglasflaschen abgefüllt. Eine kühle Lagerung bei 4°C wurde im Kühlschrank (Liebherr, Ochsenhausen) gewährleistet.

3.8.1 Messung der Medium-Osmolalität am Osmometer

Das angesetzte IMDM-Medium wurde vor Gebrauch auf seine Osmolalität untersucht. Ein physiologischer Normalbereich sollte für unsere Kulturbedingungen als Standard gelten, deshalb wurde jeder IMDM-Mediumansatz untersucht. Diese Messungen wurden im Zentrallabor der Klinischen Chemie am Osmometer (Gerät OM802) durchgeführt. Dieses besteht aus einer Kühleinrichtung und einem elektrischen Thermometer (Thermisto), dessen Widerstand der Temperatur proportional ist. Die automatische Impfung der Probelösung mit Eiskristallen bei einer bestimmten Temperatur (-6,9°C) unter dem Gefrierpunkt leitet die Kristallation ein. Durch diesen Kristalisationsprozeß kommt es zum Entstehen von Wärme und einem Temperaturanstieg. Die entstehende Wärme erreicht ein Plateau unterhalb des Gefrierpunktes, welches mit dem Plateau bekannter Standardlösungen verglichen und elektronisch gemessen werden kann. An der Messskala des Gerätes kann direkt die Osmolalität der Mediumprobe abgelesen werden. Alle benutzten IMDM-Mediumansätze befanden sich im physiologischen Bereich und wurden nach geltendem SOP AM-ZL-140/B bestimmt.

3.9 Untersuchungsparameter

In der Studie wurden folgende Zellkulturparameter zur Analyse der in vitro-Biokompatibilität erfasst:

- Morphologische Beurteilung der Kulturen im Verlauf der Versuchsdauer
Auflichtmikroskopisch
Auf- und Durchlichtmikroskopisch mit Färbemethoden
(Trypanblaufärbung, Giemsa-Färbung)
- Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblaufärbung
- Laktatmessung aus dem Mediumüberstand
- Bestimmung der LDH-Aktivität im Mediumüberstand
- Messung der alkalischen Phosphatase aus dem Mediumüberstand
- Bestimmung der Zytokinfreisetzung im Mediumüberstand

Interleukin-6 (IL-6)
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)
Interleukin-1 β (IL-1 β)
Interferon- γ (IFN- γ)
- FACS-Analyse
TriTest CD3 FITC / CD19 PE / CD45
TriTest CD3 FITC / CD4 PE / CD45 PerCP
TriTest CD3 FITC / CD8 PE / CD45 PerCP.
TriTest CD3 FITC / CD16 + 56 PE / CD45 PerCP
- Histologische Schnitte mit Färbemethoden (Hämalaun-Eosin Doppelfärbung, Giemsa-Färbung, von-Kossa-Versilberung nach Krutsay)
- Rasterelektronenmikroskopie (REM)

3.10 Dokumentation der Zellkulturen

Die Überwachung der Zellkultur wurde über den gesamten Versuchszeitraum gewährleistet. Von jeder Zellkultur wurden im Verlauf mittels digitaler Auflichtmikroskopie (Mikroskop Aristomet[®], Leitz, FRG) Bilder aufgenommen (Abb.3-9). Dies erfolgte für alle Zellkulturen bei identischer Vergrößerung, Blende und Belichtung und zufällig ausgewählter Region der Kulturplatte. Auch Bildaufnahmen von direkt gefärbten Zellkulturen (siehe Trypanblaudirektfärbung) wurden auf diese Weise dokumentiert.

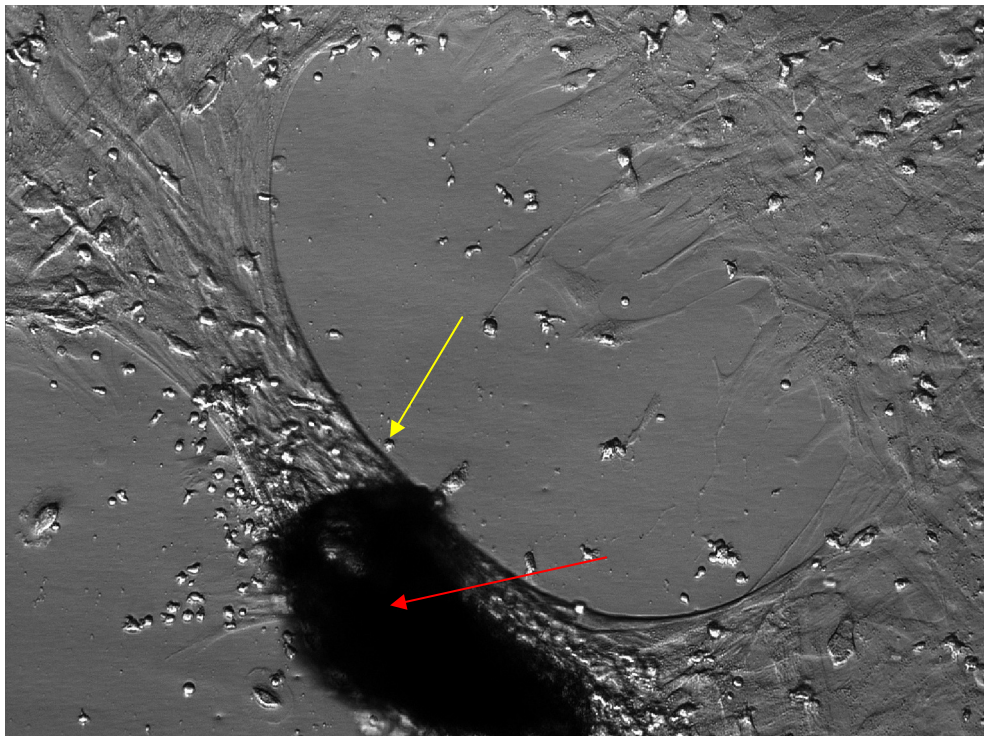


Abbildung 3-9 Auflichtmikroskopische Aufnahme einer humanen Knochenmarkszellkultur mit Knochenbruchstück „autoklaviert 121°C“, Tag 18 nach Aussaat, Vergrößerung 100x

Humane Knochenmarkszellen in Adhärenz (gelber Pfeil) mit einem autoklavierten Knochenbruchstück (roter Pfeil)

3.11 Bestimmung der Zellzahlen im abgesaugtem Medium mittels CASY®1-Zellzähler

Bevor das abgesaugte Medium bei -80°C kryokonserviert wurde, wurde bei jedem Mediumwechsel jede Probe zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in isotoner Analyseflüssigkeit CASYton® gelöst und eine Zellzahlbestimmung mittels Casy® (Zellzähler, Fa. Schärfe System GmbH) durchgeführt (Abb.3-10).

Für die untere Grenze des Messbereiches wurde ein Durchmesser von $6,25\mu\text{m}$ gewählt. Das Ergebniss einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe [Stürz 2003] hatte gezeigt, dass alle Signale unterhalb dieses Messbereichs als avital zu werten sind.

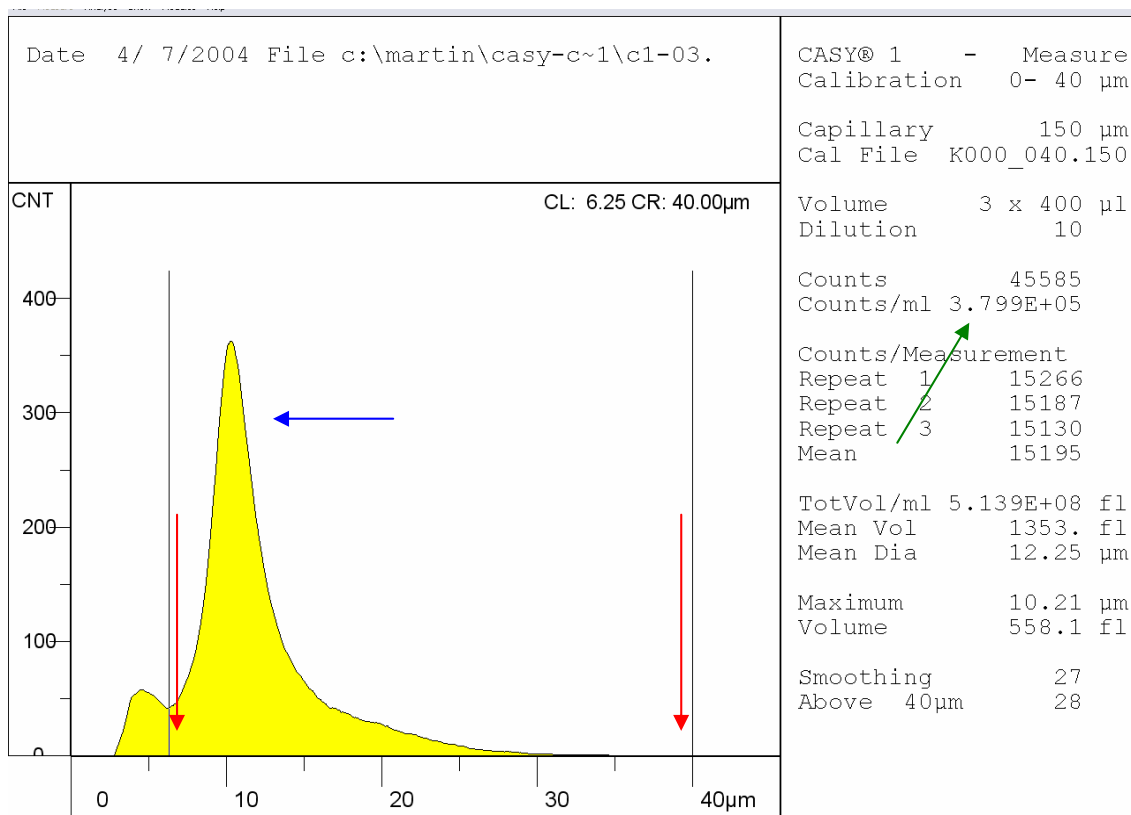


Abbildung 3-10 Beispiel: Graphik Casyzählung

Der Graph zeigt die Anzahl der Signale (y-Achse) aufgetragen in Abhängigkeit von ihrer Größe in μm (x-Achse). Das Gate für vitale Zellen wurde hierbei von $6,25\text{--}40\mu\text{m}$ gewählt (Bereich zwischen den roten Pfeilen).

grüner Pfeil: Anzahl der als vital gezählten Signale (Counts/ml)

blauer Pfeil: Peak, d.h. die meisten Signale haben eine Größe bei ca. $10\mu\text{m}$

3.12 Messung der AP, Lactatkonzentration und LDH

Zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase, der Lactatkonzentration und der Lactatdehydrogenase wurde das System Hitachi 917 des Zentrallabors der Uniklinik Marburg benutzt. Die Mediumproben, der einzelnen Zellkulturen, waren zuvor bei -80°C (Hera freeze, HFU 586 basic) in Eppendorf Tubes kryokonserviert worden. Zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase wurden die einzelnen Probenkörper bei Zimmertemperatur langsam aufgetaut und kurzzeitig durchmischt.

Darauf erfolgte unter sterilen Bedingungen die Umsetzung von 250µl der einzelnen Mediumproben in spezielle Messgefäße für die Bestimmung im Zentrallabor nach geltendem Procedere am Hitachi 917 (SOP AM-ZL-123/C). Mögliche Nachverdünnungen wurden mit isotoner NaCl-Lösungen vorgenommen und nach gleicher Methodik erneut bestimmt.

Messprinzip Alkalische Phosphatase (AP)

Hierbei wird die Phosphomonoesteraseaktivität der gesamten alkalischen Phosphatase unter Verwendung von 4-Nitrophenylphosphat (4-NPP) als Substrat zur Bestimmung der Gesamt-alkalischen Phosphataseaktivität verwendet. Dabei wirkt in Gegenwart von Zinkionen und Magnesium die alkalische Phosphatase als Phosphotransferase, spaltet also eine Phosphatgruppe von 4-NPP ab. In dieser Reaktion wird pro Zeiteinheit ein farbiges Produkt (4-NP) freigesetzt. Dieses kann bei 415nm photometrisch gemessen werden und gilt als proportionales Maß der katalytischen Aktivität der alkalischen Phosphatase.

Messprinzip Lactatkonzentration

Hierbei wird Lactat mit Hilfe des spezifischen Enzyms Lactatoxidase (LOD) zu Pyruvat oxidiert und das in erster Reaktion gebildete Wasserstoffperoxid mit Peroxidase (POD) zu einem Farbstoff umgesetzt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist dabei der Lactatkonzentration proportional.

Messprinzip Lactatdehydrogenase (LDH)

Bei dieser Messung katalysiert die LDH als NAD⁺ Oxidoreduktase die Oxidation von Lactat zur Pyruvat unter Verwendung von NAD⁺ als H⁺-Akzeptor. Die Geschwindigkeit

der NADH-Bildung ist direkt proportional der katalytischen LDH-Aktivität und wird durch die Bestimmung der Extinktionszunahme bei 340nm gemessen.

3.13 Zytokinbestimmungen

Prinzip

Der Zytokin-Nachweis mittels ELISA beruht auf dem „Sandwichprinzip“:

Mikrotiterplatten werden mit einem Capture-Antibody (spezifisch für das zu testende Zytokin) beschichtet. Das gesuchte Zytokin bindet sich nach Zugabe des Probenmaterials an die spezifischen Antikörper. Darauf entfernen Waschungen nicht gebundene Substanzen, die falsch positive Reaktionen hervorrufen können. Ein weiterer Antikörper gegen das Zielmolekül wird zugefügt, der am anderen Ende mit einem Enzym verbunden ist. Dieses ist in der Lage einen zugefügten Farbstoff durch Spaltung zu aktivieren. Dadurch kann die Aktivität des Enzyms photometrisch bestimmt werden, sie ist der Menge des Zielmoleküls proportional.

Aus den bei -80°C kryokonservierten Proben des Langzeitversuchs wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-1 β , TNF- α , IL-6 und IFN- γ bestimmt. Hierfür wurden ELISA – Sets (ELISA Sets, Fa. BD Biosciences Pharmingen) verwendet, die es ermöglichten die Konzentrationen photometrisch zu ermitteln. Die Herstellung eines Stockstandards und einer Standardverdünnungsreihe war hierfür für jedes einzelne Zytokin und bei jeder neuen Microtiterplatte nötig.

Stockstandard – Ansatz am Beispiel IL-1 β

Lösen und Mischen des Lyofilisats in 1 ml Aqua dest.

100ng/ml aliquotiert á 50 μl / Eppendorf-Cup (= 5 μg IL-1 β / Cup);

Lagerung bei -80°C , max. 6 Monate

Standardverdünnungsreihe – Ansatz am Beispiel von IL – 1 β

In 4495 μl Assay Diluent (BD OptEIA™ Assay Diluent, Fa. BD Bioscience Pharmingen) wurden 45 μl Stock Standard überführt (= 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Weitere 7 Eppendorf Cups wurden mit je 300µl Assay Diluent befüllt, um die verschiedenen Konzentrationen der Verdünnungsreihen aufzunehmen. 300µl des erneut gevortexten Stockstandard (= 1µg/ml) wurden in das 1. Eppendorfgefäß überführt und dort wiederum gemischt und gevortext. Dies fortführend ergab sich eine Verdünnungsreihe von 500pg – 250pg – 125pg – 62,50pg – 31,25pg – 15,63pg – 7,81pg.

ELISA Set (Fa. BD Biosciences Pharmingen) – Arbeitsschritte

Die Microtiterplatte (Nunc-Immuno Platten MaxiSorp F96, Fa. Nunc & Co KG) wurde mit 100µl / Vertiefung Capture Antibody + Coating Buffer (Verhältnis 1: 250) beschichtet und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte geleert und auf Zellstoff ausgeklopft

Es schloss sich ein dreimaliger Spülvorgang mit 300µl / Vertiefung Wash Buffer (25 ml BD OptEIA™ Wash Concentrate (20x), Fa. BD Bioscience Pharmingen aufgefüllt mit Aqua dest. auf 500 ml) an. Darauf wurde die Microtiterplatte 200µl / Vertiefung Assay Diluent eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und darauf erneut dreimalig mit 300µl / Vertiefung Wash Buffer gewaschen. Je 100µl der Standardverdünnungsreihe bzw. des Probenmaterials wurden darauf bei Raumtemperatur in jeweils zwei Vertiefungen der Microtiterplatte zur Doppelbestimmung überführt. Weitere zwei Vertiefungen wurden als Leerwert mit Assay Diluent befüllt. Es schloss sich eine Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur an. Mit Wash Buffer wurde daraufhin fünfmalig mit 300µl / Vertiefung die Probe ausgewaschen. Hiernach wurde der Working Detector 100 µl / Vertiefung (48µl Detection Antibody + 48µl Enzym Reagent + 11,9ml Assay Diluent), verdeckt für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Ein siebenmaliger Waschvorgang schloss sich mit Wash Buffer 300µl / Vertiefung an. Je 100µl / Vertiefung Substrat Solution (BD OptEIA™Substrate Reagent A, Fa. BD Bioscience Pharmingen + BD OptEIA™ Substrate Reagent B, Fa. BD Bioscience Pharmingen im Verhältnis 1:1) wurde darauf 30 Minuten im Dunkeln inkubiert und die Reaktion nach 30 Minuten mit 50µl Stop – Lösung (BD OptEIA™ Stop Solution, Fa. BD Bioscience Pharmingen) je Vertiefung abgestoppt.

Eine Messung mit Hilfe des Absorptionsphotometer (Titertek® Multiskan MC, Fa. Flow Laboratories GmbH) wurde innerhalb von 30 Minuten bei 570nm – 450nm Wellenlänge durchgeführt.

Jeglicher Antikörper und spezifische Reagenzien wurden entsprechend dem zu bestimmenden Interleukin gewählt und laut Vorgabe bearbeitet.

3.14 Rasterelektronenmikroskopie

Für die Untersuchung mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) sind verschiedene Eigenschaften des Probenkörpers notwendig:

- Beständigkeit unter hohem Vakuum
- Beständigkeit unter Elektronenbeschuß
- Sauberkeit der Oberfläche
- Keine störende Aufladung
- gute Sekundärelektronenausbeute

Vorbereitung der Präparate

Einige der behandelten Knochenproben wurden mit den darauf ausgesähten humanen Knochenmarkszellen nach vier Wochen Kulturdauer für das Rasterelektronenmikroskopieverfahren präpariert. Mittels ITO-Fixans [2% Lösung (0,2M Cacodylate Puffer, Fa. Serva Heidelberg / aqua dest / 25% Glutaraldehyd, Fa. Merck Darmstadt)] wurden die Probenkörper eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Daran schloss sich eine dreimalige Spülung mit 0,1M Cacodylatpuffer (Fa. Serva Heidelberg) jeweils für 5 Minuten bei Raumtemperatur an. Um die Probenkörper nun nachzufixieren und auszuwaschen erfolgte eine Inkubation mit 2% Osmiumtetroxide-Lösung (Fa. Degussa Frankfurt) in 0,1M Cacodylatpuffer (Fa. Serva Heidelberg) bei einem pH 7,2-7,4 für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wiederum ein dreimaliges Spülen der Probenkörper in 0,1M Cacodylatpuffer (Fa. Serva Heidelberg) jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur. Nach diesem Spülvorgang wurden die Probenkörper dehydriert. Dies geschah durch jeweils zehnminütiges Schwenken in

aufsteigenden Acetonkonzentrationen von 50%, 75%, 90%, 96% und 2mal hintereinander 100% wiederum bei Raumtemperatur.

Critical Point Trocknung

Prinzip

Die Critical Point Trocknung hat zum Prinzip jegliches im Probenkörper enthaltendes Wasser durch eine Ersatzflüssigkeit zu ersetzen. Diese Ersatzflüssigkeit kann langsam in einen gasförmigen Zustand gebracht werden und so dem Präparat auf schonende Weise wieder entzogen werden. Als Ersatzflüssigkeit eignet sich insbesondere Kohlendioxid (CO₂), da es unterhalb von 31°C durch Druckerhöhung flüssig wird. Ein Verdampfen kann durch abschließende geringe Erhöhung der Temperatur erreicht werden.

Die in 100% Aceton befindlichen Präparate wurden in geeignete Probenhalter übertragen und in die Proben-Druckkammer der Critical Point Kammer (Balzer Union, Lichtenstein) rasch überführt. Es erfolgte darauf eine Bedeckung der Probenkörper mit Aceton und die sorgfältige Schließung der Kammer mittels Schraubdeckel. Nun wurde die Kammer auf 5°C heruntergekühlt und ein Austausch des Acetons mit flüssigem CO₂ durchgeführt.

Danach wurde die Kammer erhitzt, das CO₂ wechselte von flüssig zu gasförmig. Der vollständige Austausch des Acetons konnte so durch erneute Waschvorgänge (ca. 7x) erreicht werden. Die Proben konnten darauf nach kontrollierter Druckreduzierung trocken entnommen werden und wurden in einem feuchtigkeitsgeschütztem Exsikkator aufbewahrt.

“Sputtern“ der Präparate

Prinzip

Die Elektronenmikroskopie benötigt eine sehr dünne, leitfähige Schicht, die das zu mikroskopierende Gewebe überziehen soll, jedoch wichtige Strukturen nicht zerstören oder verdecken darf. Möglich wird dies durch das Sputterverfahren. Mittels eines Induktionsstroms, der aus einem „Target“ (z.B. Gold) Moleküle löst, kann eine Bedampfung des Probekörpers erreicht werden.

Die Probenkörper wurden in das Bedampfungsgerät (Sputter Coaters S150, Edwards, West Sussex, UK) eingebracht. Darauf wurde in dem Gerät ein Vakuum erzeugt und die Kammer mit Argongas geflutet. Durch dieses Prozessgas konnte eine Argon-Atmosphäre mit einem Druck von ca. 0,1mbar entstehen. Durch einen Sputterstrom von 40mA konnten aus einem massiven Goldblock Moleküle gelöst werden und als dünne, leitfähige Schicht auf die Probenkörper übertragen werden.

Die so vorbereiteten Probenkörper wurden hierauf mit dem Rasterelektronenmikroskop (ISI-SX-30, ISI, GB) untersucht.

3.15 Durchflusszytometrie - FACS

Prinzip

Zur Bestimmung von Oberflächenmolekülen und Proteinen steht als Verfahren die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS) zur Verfügung. Wichtiges Prinzip der FACS-Analyse ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper gegen eben diese Proteine und Oberflächenmoleküle durchgeführt wird. Mit dieser Markierung ausgestattet werden die Zellen hydrodynamisch fokussiert, d.h. nacheinander an einem Argon-Laserstrahl vorbeigeleitet. Der monochromatische Laserstrahl ist in der Lage die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes auf ein höheres Energieniveau zu heben, aus welchem diese nach

dem Laserpuls unter Abgabe von Photonen wieder auf ihr Ursprungniveau zurückkehren. Ein Photonendetektor misst die emittierte Photonenkonzentration. Hierbei ist die gemessene Photonenkonzentration der Menge an Farbstoffantikörper/Zelle proportional. Es ist auch möglich mehrere Farbstoffe gleichzeitig zu messen, da diese verschiedene Emissionspektren besitzen, und so durch Wahl verschiedenster Antikörper bestimmte immunphänotypische Merkmale von Zellen abzufragen. Man nennt diese Merkmale „cluster of differentiation“ (CD). Weiterhin können durch Streuung und Beugung des Lichtstrahls (z.B. Forward Scatter, Side Scatter) Daten über verschiedenste Binnenstrukturen der Zellen (Granularität des Zytoplasmas, Zellkerngröße, Zellgröße etc.) gewonnen werden.

Zellaufbereitung

Die Zellkulturen wurden nach Absaugen des Mediums einmal mit PBS gespült und beide Suspensionen wurden in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Eine Lösung der angewachsenen Zellen wurde durch 2ml Accutase® erreicht und eine Überführung der Zellsuspension in oben genanntes Zentrifugenröhrchen durchgeführt.

Die so gewonnene Zellsuspension wurde zentrifugiert (10min bei 3000U/min und 10°C). Zwei Waschgänge des Zellpelets mit TBS/BSA – Puffer (triphosphat buffered saline =TBS, bovine serum albumine = BSA) schlossen sich an, unterbrochen durch weiteres Zentrifugieren (10min bei 3000U/min und 10°C). Weiterhin wurde eine Zellzählung mittels Casy® 1TCC (Fa. Schärfe System GmbH) und am Hämozytometer mit einer Trypanblaufärbung durchgeführt.

Fluoreszenzmarkierte-Oberflächenantikörper

Die folgenden spezifischen Oberflächenantikörper wurden über zwei Stunden bei Raumtemperatur mit der gewonnenen Zellsuspension inkubiert:

TriTest CD3 FITC / CD19 PE / CD45 PerCP; Fa. Becton Dickinson.

TriTest CD3 FITC / CD4 PE / CD45 PerCP; Fa. Becton Dickinson.

TriTest CD3 FITC / CD8 PE / CD45 PerCP; Fa. Becton Dickinson.

TriTest CD3 FITC / CD16 + 56 PE / CD45 PerCP; Fa. Becton Dickinson.

Fluorochrome

FITC = Fluorescein isocyanat fluoresziert grün bei einem Maximum von 519nm

PE = Phycoerythrin, bei 578nm Fluoreszenzmaximum (orange)

PerCP = Peridin Chlorophyll, rote Fluoreszenz bei 675nm

CD – Antigene

CD – 3

Der Proteinkomplex CD – 3 besteht aus mindestens sechs Ketten, wobei jede Kette ein Molekulargewicht von ca. 20 – 30kD aufweist. Das Antigen selbst ist die ϵ – Kette des T-Zell Antigen Rezeptors (TCR) und findet sich auf T-Lymphozyten, wo es für die Oberflächenexpression des TCR und die Signalübermittlung mitverantwortlich ist.

CD – 4

Das Adhäsionsmolekül CD-4 ist ein Corezeptor von MHC II Molekülen und Hauptrezeptor des HI-Virus. Dieses einkettige transmembranöse Glykoprotein hat ein Molekulargewicht von 59kD und kommt auf T-Helfer-Zellen vor. Der zytoplasmatische Anteil von CD-4 ist mit der Tyrosin Kinase p56 assoziiert.

CD – 8

Mit Hilfe von CD – 8 können zytotoxische- und Suppressor – T – Zellen erkannt werden. Das Antigen findet sich an der α – Untereinheit eines Disulfidbrückenkomplexes (32kD), deren zytoplasmatische Seite mit der Tyrosin Kinase p56 verbunden ist. CD – 8 bewirkt in Zusammenarbeit mit MHC I Molekülen zum einen eine verstärkte Bindung zwischen den CD8+ T-Lymphozyten und den Zielzellen, zum anderen eine vermehrte Reaktivierung ruhender T-Zellen.

CD – 16 / CD - 56

Die Kombination von Antikörpern gegen CD-16 und Antikörpern gegen CD-56 ermöglicht die Identifikation von Natürlichen Killerzellen (NKZ).

Das CD – 16 Antigen ist ein Fc – Rezeptor für IgG mit einem Molekulargewicht von 50 bis 70kD. Es ist bei der Phagozytose und der antikörpervermittelten zellulären Cytotoxizität beteiligt.

Das Adhäsionsmolekül CD-56 ähnelt dem Neural Zell Adhäsions Molekül (NCAM, mit Molekulargewichten von 120kD, 140kD und 180kD) und lässt sich außer an NKZ auch bei manchen Leukämien und in Nervengewebe nachweisen.

CD – 19

Der Antikörper gegen CD-19 bindet an ein Membranglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 90kD, welches auf humanen B-Lymphozyten jeden Reifungsgrades zu finden ist. CD-19 bildet einen Komplex mit CD-21 (CR2) und CD-81 (TAPA – 1). Vermutlich ist dieses Antigen an der Aktivierung und Proliferation der B-Lymphozyten beteiligt.

CD – 45

Durch CD-45 werden Leukozyten identifiziert. Es handelt sich um ein humanes Leukozytenantigen der „leucocyte common antigen“ (LCA) Familie mit einem Molekulargewicht von 180 bis 220kD.

FACS-Analyse

Die eigentliche Durchflußzytometrie wurde im Labor der Hämatologie der Universitätsklinik Marburg durchgeführt. Die hierbei gewonnenen Daten wurden in Form eines Koordinatensystems (Dot Plot) dargestellt, deren Analyse mit dem Programm BD Cellquest™ Pro durchgeführt wurde. Hierbei ist es möglich Zellsubpopulationen durch das Setzen von Gates abzugrenzen und genauer zu analysieren. Eine Kontrollzellprobe wurde vor jeder Immunphänotypisierung mit Antikörpern inkubiert und bestimmt, um Fehlinterpretationen zu verhindern.

3.16 Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblaufärbung

Mit Hilfe eines Hämozytometers und einem Auflichtmikroskop (Mikroskop Aristomet®, Leitz, FRG) mit 10-40fach vergrößerndem Objektiv wurden nach vier Wochen die Zellkulturen zur Vitalitätsbestimmung ausgewertet.

Als Differenzierungsmerkmale wurden „helle Zelle“ = lebende Zelle und „dunkle Zelle“ (d.h. Farbstoff in die Zelle eingedrungen) = tote Zelle festgelegt.

Nach dem Entfernen des Mediums wurde zur Ablösung der Zellen aus dem Matrixverbund Accutase® verwendet. 20µl der so gewonnenen Zellsuspension (mindestens 2×10^5 – höchstens 4×10^7 Zellen/ml) wurden mit 80µl einer 0,5%igen Trypanblaulösung inkubiert und auflichtmikroskopisch im Hämozytometer ausgezählt. Weiterhin wurden Kontrollkulturen der Knochenmarkzellen ohne Spongiosascheiben nach vierwöchiger Kultur auf gleiche Weise ausgewertet. Zellen die im Matrixverband der Kulturen verblieben waren, entgingen diesem Auswertverfahren.

3.17 Giemsa Färbung:

Um einen besseren Farbkontrast zwischen Zellen, Zellkernen, Interzellulärsubstanz und Knochen herzustellen wurde eine Färbung nach Giemsa durchgeführt. Eine mikroskopische Auswertung erfolgte mittels Auflichtmikroskopie (Mikroskop Aristomet[®], Leitz, FRG). Hierbei stellt sich Osteoid blassblau, Zellkerne unterschiedlich blau, Kollagen rosa und Matrix rosa bis zartrosa dar.

Die Knochenproben wurden in 4% Formalinlösung über sechs Tage fixiert, dabei wurde das Formalin zweimal täglich gewechselt.

Um das Formalin aus den Knochenproben zu entfernen, schloss sich ein mehrmaliger Spülvorgang mit Aqua dest. (3x 15min Spülung bei Raumtemperatur) an. Die eigentliche Färbung wurde darauf mit 4% Giemsalösung (30min Färbung bei Raumtemperatur) durchgeführt. Zur Differenzierung wurde hiernach Augua dest. mit 1-2 Tropfen Eisessig benutzt, um überschüssigen Farbstoff durch Spülung zu entfernen. Anschließend wurden die Knochenpräparate an der Luft und staubgeschützt getrocknet.

3.18 Knochenprobenfixation

Nach Beendigung des Untersuchungszeitraums der Zellkulturen wurden die Knochenproben in separate flüssigkeitsdurchlässige Kunststoffbehältnisse (Tissue-Tek Uni-Cassets, Fa. Miles, Naperville, Irland) überführt. Eine Knochenidentifikation wurde durch Filterpapier mit den Fixdaten der Knochenprobe im Behältnis garantiert. Die Fixation bei 4°C wurde dann unter Magnetrührermischung in einer 1,4% Paraformaldehydlösung für 24 Stunden durchgeführt.

Darauf wurden die Kunststoffbehältnisse (Tissue-Tek Uni-Cassets, Fa. Miles, Naperville, Irland) mit den Knochenproben als abschließender Schritt der Fixation in 0,04 M Phosphatpuffer + 10 % Succrose Lösung umgelagert und für zweimal 8 Stunden, unter Einsatz eines Magnetrührers, bei 4°C gewaschen.

Eine Entwässerung der Proben mit der aufsteigenden Alkoholreihe und die Entfettung mit Xylol schlossen sich nach folgendem Schema an:

Alkohol 70 % 4 Tage, Alkohol wurde täglich gewechselt

Alkohol 80 % 1 Tag

Alkohol 90 % 1 Tag

Alkohol 96 % 2 Tage, Alkohol wurde täglich gewechselt

Alkohol absolut 1 Tag

Xylol 1 Tag

Xylol 1 Tag

Ansatz Paraformaldehydlösung 1,4%

Zusammensetzung der Ansatzbestandteile

- 8%ige Paraformaldehydstammlösung
 - 40g Paraformaldehyd (Merck, Cat.-No. 4005)
*gelöst in 500 ml Aqua dest. , erwärmen, Neutral-pH einstellen
einfrieren bei -20°C*
- 0,04M Phosphatpuffer + 10% Succrose (pH 7,4)
 - 40ml 1M Phosphatstammlösung
 - 100g Succrose (Roth, Cat.No. 9097)
 - 10ml 10% NaN₃ Lösung
 - 1g NaN₃ (Merck, Cat.No. 6544)
 - 10ml Aqua dest.
*in 1000ml Aqua dest. lösen
pH-Wert auf 7,4 einstellen*

Ansatz Lösung Paraformaldehydlösung 1,4%

- 35ml 8% Paraformaldehydstammlösung
- 63ml Aqua dest.
- 100ml 0,04M Phosphatpuffer + 10% Succrose
- Einstellung des pH-Werts auf 7,4

Einbettung der Knochenproben

Nach der Fixation wurden die Knochenproben in Technovit® 9100 New (Kulzer) eingebettet. Die Knochenproben wurden in Plastikgefäße (2,5/5ml; Fa.Kobe Marburg) eingestellt und mit Polymerisationsflüssigkeit aufgefüllt. Eine Evakuierung bei 600mbar für einige Minuten schloss sich daraufhin an. Luftblasen konnten so aus der Polymerisationsflüssigkeit entfernt werden. Unter luftdichtem Verschluss erfolgte darauf die Auspolymerisation der Probenkörper im Kühlschrank bei -20°C für 48 Stunden. Darauf konnten die Blöcke aus den Plastikgefäßen (2,5/5ml; Fa.Kobe Marburg) befreit werden (Abb.3-11).

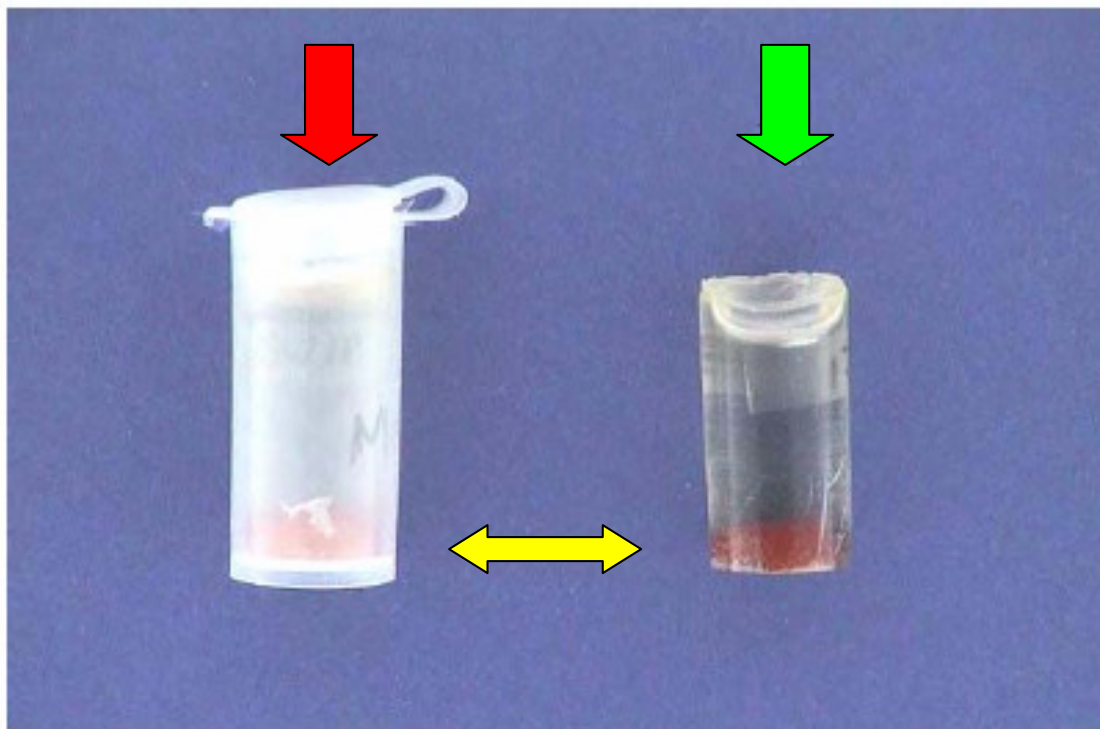


Abbildung 3-11 Eingebettete Knochenproben

roter Pfeil: Knochenpräparat eingebettet und im Plastikgefäßen (2,5/5ml; Fa.Kobe Marburg)

grüner Pfeil: auspolymerisierter Block mit Knochenpräparat/Probenkörper

gelber Pfeil: Knochenpräparat/Probenkörper

3.19 Histologisches Dünnschnittverfahren

Um Dünnschnitte der Knochenproben zu erhalten, wurde ein Hartstahlmikrotom (Fa. Reichert-Jung, Polycut E) mit Hartstahlmessern verwendet (Abb.3-12). Als Schneideflüssigkeit benutzten wir 30% Alkohol. Mit diesem Gerät konnten so 5µm dicke Dünnschnitte aus den auspolymerilisierten Knochenprobenkörpern hergestellt werden, die auf mit Ponal beschichtete Objektträger ausgestrichen wurden. Die Dünnschnitte wurden weiterhin mit Polyethylenfolie überdeckt, in eine Präparatpresse eingespannt und für 48 Stunden bei 50°C im Brutschrank getrocknet.

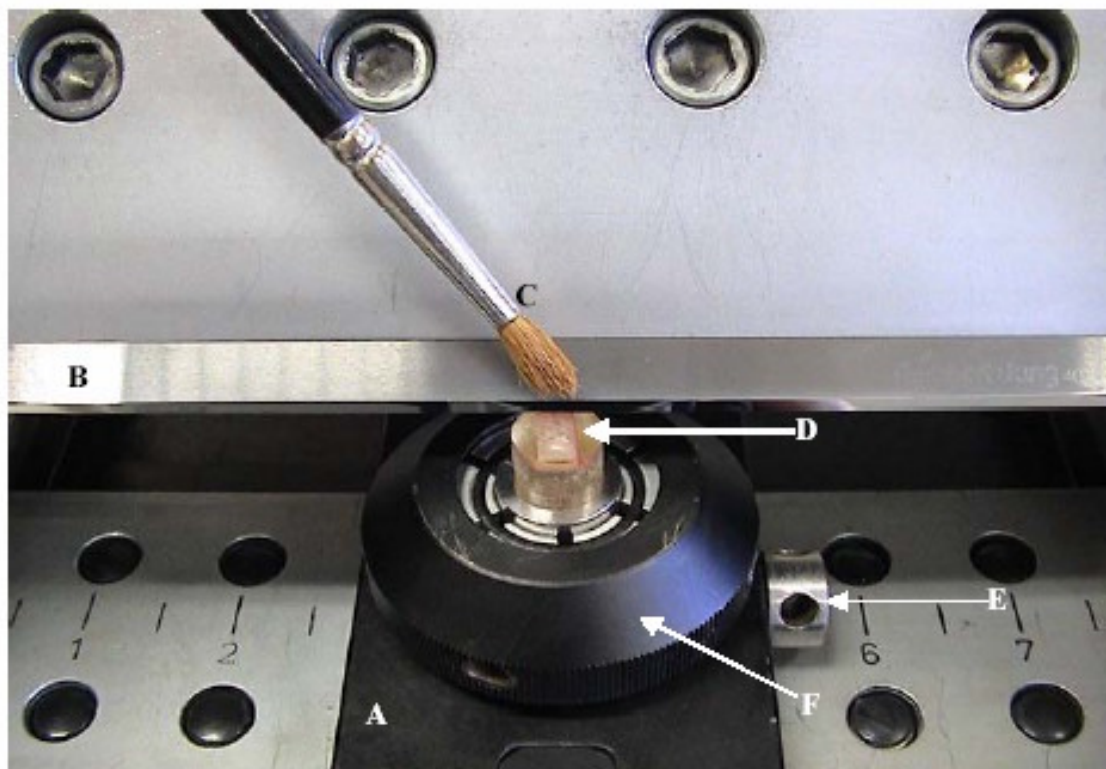


Abbildung 3-12 Hartstahlmikrotom

- A: Präparateschlitten
- B: Hartstahlmesser
- C: Pinsel
- D: auspolymerilisierter Block mit Probenkörper
- E,F: Feststellgewinde

Beschichtung der Objektträger mit einem Ponal-Lysin-Gemisch

Materialien

- Objektträger (SuperFrost® Plus; Art.No. 041300)
- Ponal-Holzleim (Fa. Henkel)
- Poly-L-Lysin-Lösung 0,1%ig (Fa. Sigma; P 8920)Ponal und Poly-Lysin

Ponal und Poly-Lysin wurden dabei in einem bestimmten Verhältnis gemischt:

- 2 Volumenanteile 2%-iges Ponal (gelöst in Aqua dest.)
- 1 Volumenanteil 0,01%-ige Poly-L-Lysin (gelöst in Aqua dest.)

Die Objektträger wurden in einem Objektträgerständer stehend, für 10min in das Ponal-Lysin-Gemisch gestellt und danach für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

Entacrylierung der eingebetteten Dünnschnitte

Um die in Kunststoff eingebetteten Knochenproben einer histologischen Auswertung zugänglich zu machen, musste der zugeführte Kunststoff wieder entfernt werden. Man nennt diesen Vorgang Entacrylierung oder Entplastinierung. Grund für dieses Vorgehen sind die unbefriedigenden Ergebnisse der histologischen Färbungen, da sich der verwendete Kunststoff mitfärbt oder vom Farbstoff nicht durchdrungen werden kann. Beides beeinflusst die Auswertung der histologischen Dünnschnitte. Gebrauchsfertig steht zur Entfernung des Kunststoffs 2-Methoxyethylacetat zur Verfügung. Zur Vorbereitung auf die wässrigen Färbelösungen müssen die Dünnschnitte jedoch rehydriert werden. Dies gelingt mit Hilfe der absteigenden Alkoholreihe:

2-Methoxyethylacetat 20 min

2-Methoxyethylacetat 20 min

2-Methoxyethylacetat 20 min

Äthanol absolut 3 min

Äthanol 96%ig 3 min

Äthanol 80%ig 3 min

Äthanol 70%ig 3 min

Äthanol 50%ig 3 min

Aqua dest. 3 min

Aqua dest. 3 min

3.20 Färbung der Technovit-Dünnschnitte

Giemsa-Färbung

Um einen schnellen, guten Farbkontrast zwischen Interzellulärsubstanz, Zellen, sowie Weich- und Hartgewebe darzustellen, wurden die Dünnschnitte nach der Giemsa-Färbemethode gefärbt. Hierbei stellen sich im Dünnschnittpräparat Zellen und Zellkerne unterschiedlich blau, mineralisierte Matrix sowie Kollagen hingegen zartrosa bis rosa und Osteoid blassblau dar.

Herstellung der Färbelösung

- 40ml Giemsa-Lösung
- 160ml Aqua dest.

Vor jeder Färbung wurde die Giemsa-Lösung durch Verdünnen mit Aqua dest. stets frisch angesetzt.

Vor der eigentlichen Färbung wurden die Dünnschnitte der Knochenproben dreimalig für 20 Minuten in 2-Methoxyethylacetat entblastet und darauf zweimal in Aceton für je 5 Minuten eingesetzt. Hierauf schloss sich ein zweimaliger Spülvorgang in Aqua dest. zu je drei Minuten an.

Zur Färbung wurden die Dünnschnitte der Knochenproben für 30 Minuten in die frisch angesetzte Giemsa-Lösung eingestellt und darauf differenziert. Das Differenzieren vollzog sich durch Einsetzen der Dünnschnitte in verschiedene Chemikalien in der Abfolge (0,1%iger Essigsäure, dann in 70%igem Alkohol, sowie in 96%igem Alkohol – jeweils kurz eingetaucht). Hierauf konnten die Dünnschnitte in Xylol für je fünf Minuten dehydratisiert und danach mit Entellan eingedeckt werden.

Die Hämalau-Eosin Doppelfärbung (H&E)

Als weitere Übersichtsfärbung wurden die histologischen Dünnschnitte der Knochenproben in zwei Schritten mit Hämatoxylinlösung und Eosin gefärbt. Hämalau lässt basophile Strukturen, wie z.B. Zellkerne blau, dunkelviolett bis schwarz erscheinen. Hingegen stellt das Eosin, ein Xanthen-Farbstoff, Strukturen wie Keratin, Kollagen und das Zytoplasma rot-orange dar.

Herstellung der Färbelösung

Eosin:

- 1ml Certstatin Eosin G
- 100ml 70%iges Äthanol

Das Certstatin Eosin G wurde kurz vor Gebrauch im Äthanol gelöst und mit etwas Eisessig angesäuert.

Hämalau:

- 2,5g Hämatoxylin
- 0,5g Natriumjodat
- 2500ml Aqua dest.
- 125g Chloralhydrat
- 2,5g Zitronensäure
- 125g Aluminiumkaliumsulfat

Aluminiumkaliumsulfat, Hämatoxylin und Natriumjodat wurden in Aqua dest. gelöst. Am nächsten Tag dann Zugabe von Chloralhydrat und Zitronensäure. Darauf Filtration nach 5 minütigem Kochen der Lösung

Vor der eigentlichen Färbung wurden die Dünnschnitte der Knochenproben dreimalig für 20 Minuten in 2-Methoxyethylacetat entblastet und darauf zweimal in Aceton für je 5 Minuten eingesetzt. Hierauf schloss sich ein zweimaliger Spülvorgang in Aqua dest. zu je drei Minuten an.

Zur HE-Färbung wurden die Dünnschnitte für 30 Minuten in Hämalun eingestellt, um darauf, in Leitungswasser für 10 Minuten gebläut zu werden. Im Anschluss daran wurde eine fünfminütige Gegenfärbung mit Eosin durchgeführt. Nach einem weiteren Spülvorgang in Aqua dest. wurden die Dünnschnitte einer aufsteigenden Alkoholreihe (Äthanol 50%ig, Äthanol 70%ig, Äthanol 80%ig, Äthanol 96%ig und Äthanol absolut je 3 Minuten) zugeführt und darauf eine Dehydratisierung zweimalig mittels Xylol für 5 Minuten durchgeführt. Daran schloss sich die Eindeckung mit Entellan.

Die modifizierte „von-Kossa-Versilberung“ nach Krutsay

Nachdem Krutsay 1963 die „von-Kossa-Versilberung“ modifizierte, wird sie auch für kunstharzeingebettete Hartmikrotomschnitte empfohlen. Die durch die Versilberung sehr kontrastreichen Bilder stellen mineralisiertes Gewebe tiefschwarz und Mineralisationsfronten granuliert dar. Alle übrigen Strukturen können durch eine Gegenfärbung dargestellt werden. In unserem Fall wurde dafür die Trichrom-Goldner-Färbung benutzt. Diese stellt Osteoid rot, Zytoplasma rötlich-braun und Zellkerne blau-schwarz dar.

Herstellung der Färbelösung

- 5%ige Silbernitrat- Lösung
- 10g Silbernitrat
- 200ml Aqua dest.

Das Silbernitrat wurde im Aqua dest. gelöst und die Lösung lichtgeschützt aufbewahrt.

Natriumkarbonat-Formaldehyd-Lösung

- 10g Natriumkarbonat
- 50ml 37%ige Formaldehydlösung (wasserfrei)
- 150ml Aqua dest.

Nach der Lösung des Natriumkarbonat in Aqua dest. wurde die Formaldehydlösung zugesetzt.

Natriumthiosulfatlösung

- 7g Natriumthiosulfat
- 133ml Aqua dest.

Das Natriumthiosulfat wurde im Aqua dest. gelöst.

Vor der eigentlichen Färbung wurden die Dünnschnitte der Knochenproben dreimalig für 20 Minuten in 2-Methoxyethylacetat entblastet und darauf zweimal in Aceton für je 5 Minuten eingesetzt. Hierauf schloss sich ein zweimaliger Spülvorgang in Aqua dest. zu je drei Minuten an.

Für die „von-Kossa-Versilberung“ wurden die Dünnschnitte für 30 Minuten in Silbernitratlösung eingestellt und darauf dreimalig mit Aqua dest. gespült. Hierauf schloss sich eine Reduzierung in Natriumkarbonat-Formaldehyd für acht Minuten an. Vor dem Fixieren wurde wieder mit Aqua dest. 10 Minuten gespült und darauf mittels Natriumthiosulfat für fünf Minuten fixiert. Der darauf folgende 15-minütige Spülvorgang wurde mit Leitungswasser durchgeführt.

Nach dieser Färbung schloss sich die Gegenfärbung nach Trichrom-Goldner an. Es folgte ein 10-minütiges Einstellen in Eisenhämatoxylin und darauf ein Bläuen in Leitungswasser (ebenfalls 10 Minuten). Die Färbung wurde dann in Säurefuchsin-Ponceau (7 Minuten) durchgeführt und hiernach mit 1%iger Essigsäure abgespült. Es schloss sich das Differenzieren in Phosphormolybdänsäure-Orange G für sieben Minuten an. Nach erneutem Abspülen mit 1%iger Essigsäure wurden die Dünnschnitte einer aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt. Nach fünf Minuten in Xylol wurden die Dünnschnitte mit Entellan eingedeckt.

3.21 Versuchsmaterialien

Geräte:

Laborgeräte:

Critical Point Kammer	Balzers, Liechtenstein
Sputter coater S150	Edwards, West Sussex, GB
Rasterelektronenmikroskop ISI SX 30	ISI, GB
Mikrotom Polycut E	Reichert-Jung, Deutschland
Bandelin Sonorex TK 52	Bandelin Electronic, Berlin,
Pipetman® P 20, P 200, P 1000	Gilson Inc., Middleton, USA
Pipetus®-akku	Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt
Eppendorf Multipipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetman® Ultra Multichannel 8x300	Gilson Inc., Middleton, USA
Labofuge 400R	Heraeus Instruments, Hanau
Biofuge 13	Heraeus Instruments, Hanau
Schüttler Swip KS-10	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Vortex: REAX 2000	Heidolph, Kelheim
Heizplatte mit Magnetrührer MR2002	Heidolph, Gießen
Autoklav 3850 EL	Tuttnauer, NY, USA
Hitzeschrank, SUT 6200	Heraeus, Hanau
Feinwaage I 1801	Sartorius GmbH, Göttingen
Auflichtmikroskop Aristomet®	Leitz, FRG

Geräte für Probenschnitt / -bearbeitung und Zubehör:

EXAKT-Trennschleifsystem	EXAKT Apparatebau GmbH, Norderstedt
Diamant-Trennband D64 0,2mm	DIA-Plus Walter Messner GmbH, Oststeinbek
Bohrer PF360	Proxxon GmbH, Niersbach
Schublehre	Mitutoyo, Mexico
Rotator Reax2	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

Zellkultur:

Brutschrank BB-16 CU	Heraeus Instruments, Hanau
Durchlichtmikroskop DM IL Fluo	Leica, Wetzlar
Vertikal Laminar Flow Gerät UV 1800	Uniflow
Bunsenbrenner	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Neubauer-Kammer	Schreck, Hofheim

Analytische Geräte:

Analysegerät Hitachi 917	Roche, Mannheim
Casy® 1 TTC, Version SC1 TTC	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Digital-pH-Meter 646	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Titertek® Multiskan MC	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim

Kühlgeräte:

-80° C Hera freeze, HFU 586 basic	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
-20° C	Liebherr, Ochsenhausen
+4° C	Liebherr, Ochsenhausen

Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien:

Zellkultur:

Iscove's modified Dulbeccos medium (IMDM) Pulver	Gibco, Karlsruhe
Pferdeserum hitzeinaktiviert	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
Fetales Kälberserum hitzeinaktiviert PAA	Laboratories GmbH, Pasching, AU
Certomycin®	Essex Pharma, München
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Hydrocortison	Sigma Diagnostics, St.Louis, USA
Interleukin-3 (IL-3) Human Recombinant	Calbiochem® Merck, Darmstadt
Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GMCSF) human	Calbiochem® Merck, Darmstadt

Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching (AU)
Trypsin – EDTA Solution	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Cellstar Gewebekulturschalen 35 / 10 mm	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen

Interleukin- und Enzymbestimmung:

Lactate Reagenz	Roche, Mannheim
Alkalische Phosphatase IFCC liquid Reagenz	Roche, Mannheim
LDH IFCC-liquid Reagenz	Roche, Mannheim
BD OptEIA™ Human Il-6 ELISA Set	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Human Il-1 β ELISA Set	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Human IFN- γ ELISA Set	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Human TNF ELISA Set	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
Capture Antibody, Anti Human Il-6 (Il-1 β , IFN- γ , TNF- α), liquid, 1,0 ml,	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
Detection Antibody, Biotinylated Anti Human Il-6 (Il-1 β , IFN- γ , TNF- α), liquid, 1,0 ml,	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
Enzym Reagent, Avidin-horseradish peroxidase conjugate, liquid, 1,0 ml,	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
Standards Recombinant Human Il-6 120 ng / vial (Il-1 β 100 ng / vial, IFN- γ 75 ng / vial, TNF- α 110 ng / vial), Lyophilized,	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Assay Diluent	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Substrate Reagent A	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Substrate Reagent B	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Stop Solution	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Coating Buffer Sodium	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Wash Concentrate (20x)	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA

Nunc-Immuno Platten MaxiSorp F96

Nunc & Co KG, Wiesbaden

Färbungen:

Osmiumtetroxid

Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Giemsa Lösung,

Merck, Darmstadt

Sterilisation und Knochenaufbereitung, Knochenmarkpräparation:

PBS – Dulbecco w/o Ca²⁺, Mg²⁺

Biochrom AG, Berlin

Biocoll Separating Solution, 1,077

Biochrom AG, Berlin

Histopaque®, 1,119

Sigma Diagnostics, St.Louis, USA

Earle's Salt Solution

Biochrom AG, Berlin

Penicillin mit Streptomycin

PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU

Gentamicin

Sigma Diagnostics, St.Louis, USA

Amphotericin B

Sigma Diagnostics, St.Louis, USA

0,2% Liquemin

Hoffmann-La Roche

Chemikalien und Puffer:

NaHCO₃

Merck, Darmstadt

Aceton

Merck, Darmstadt

NaH₂PO₄

Merck, Darmstadt

Na₂HPO₄

Merck, Darmstadt

Paraformaldehyd-Pulver

Merck, Darmstadt

NaOH

Merck, Darmstadt

Kupfer-(III)-Sulfat-Pentahydrat

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Ethanol

Merck, Darmstadt

Formaldehydlösung 37 %

Merck, Darmstadt

Methanol

Riedel-de Haën AG, Seelze

Natrium Cacodylat

SERVA, Heidelberg

Poly-L-Lysine Solution 0,1 % w/v in water

Sigmy-Aldrich Co, St. Louis, USA

Glutaraldehydlösung 25%

Merck, Darmstadt

Technoviteinbettung:

Xylol	Merck, Darmstadt
Technovit 9100 Neu	Heraeus Kulzer, Hanau
Tissue-Tek Uni-Cassets	Miles, Naperville, Irland
Polyethylenfolie	Heraeus Kulzer, Hanau

FACS:

Bovines serum albumine (BSA)	SERVA, Heidelberg
TBS	Merck, Darmstadt
TriTest CD3 FITC / CD19 PE / CD45 PerCP	Becton Dickinson, USA
TriTest CD3 FITC / CD4 PE / CD45 PerCP	Becton Dickinson, USA
TriTest CD3 FITC / CD8 PE / CD45 PerCP	Becton Dickinson, USA
TriTest CD3 FITC / CD16 + 56 PE / CD45 PerCP	Becton Dickinson, USA

Verbrauchsmaterialien:

Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Safe-Lock Tubes 2,0ml	Eppendorf AG, Hamburg
15 ml, 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon®)	Becton-Dickenson Labware, USA
10ml Pipetten (Cellstar®)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen 200µl, 1000µl	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Pasteur Pipetten	Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt
Eppendorf Biopur® Combitips plus	Eppendorf AG, Hamburg
Unolok sterile Spritzen 50ml	HMD Healthcare Limited, GB
Millex®-GS, 0,22µm Spritzenaufsatzfilter	Millipore Corp., Bedford USA
Falcon® Bottle Top Filter 150ml	Becton-Dickinson
Objektträger Super Frost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Deckgläser rund Ø 2 cm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Casy-ton	Schärfe, Reutlingen
Casy cups	Schärfe, Reutlingen

3.22 Statistik

Um die Mittelwerte der durchgeführten Messungen (Interleukine, Enzyme und Daten) der beiden unterschiedlichen Verfahren und Kontrollkulturen zu vergleichen, wurde der t-Test nach Student für unverbundene Stichproben auf die Ergebnisse angewandt.

Dieser Test ermöglicht den Vergleich der Mittelwerte zweier unterschiedlich großer Stichprobenräume

Die Teststatistik errechnete sich hierbei aus:

$$T = \frac{\bar{y} - \bar{x}}{s_p} \cdot \sqrt{\frac{m \cdot n}{m + n}}$$

T = Prüfgröße

\bar{y} , \bar{x} = Mittelwerte der beiden Gruppen

m = Anzahl der Werte in der Kontrollgruppe

n = Anzahl der Werte in der Prüfgruppe

$$s_{p^2} = \frac{(m-1) \cdot s_x^2 + (n-1) \cdot s_y^2}{m+n-2} = \text{gepoolte Varianz}$$

s_x^2, s_y^2 = Varianzen der Messreihen x und y

Bei der weiteren Auswertung wurde noch die Anzahl der Freiheitsgrade benötigt:

$$f = m + n - 2$$

Lag nun der errechnete Wert T über dem „kritischen Wert“ t für die entsprechende Anzahl der Freiheitsgrade f , so bestand eine Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe.

Rechenbeispiel:

IL – 6 Spiegel bei zweier Messreihen:

Messreihe „A“

C Z 2	892,878
C V Z 1	490,938
C VI Z 2	517,566
C VII Z 2	824,964
C VIII Z 2	110,112
Zellen	224,040
Cells	451,060
Mittelwert Zellen (pg / ml)	501,651
Standardabweichung	286,032639

$$m = 7$$

$$\bar{X} = 502 \text{ pg / ml}$$

$$s_x = 286,0$$

Messreihe „B“:

C V 2	475894,123
C V 3	377778,986
C VI 2	377041,080
C VI 6	303471,064
C VII 2	352874,002
C VII 4	489959,686
C VIII 2	263143,582
C VIII 3	327669,654
Mittelwert autolog (pg / ml)	370979,022
Standardabweichung	78953,7518

$$n = 8$$

$$\bar{Y} = 370979 \text{ pg / ml}$$

$$s_y = 78953,$$

Berechnung:

$$s_p = \sqrt{\frac{(m-1) \cdot s_x^2 + (n-1) \cdot s_y^2}{m+n-2}} = \sqrt{\frac{(7-1) \cdot (286,0)^2 + (8-1) \cdot (78953,8)^2}{7+8-2}}$$

$$s_p = 57936,576$$

$$T = \frac{\bar{y} - \bar{x}}{s_p} \cdot \sqrt{\frac{m \cdot n}{m + n}} = \frac{370979 - 502}{57936,576} \cdot \sqrt{\frac{7 \cdot 8}{7 + 8}} = \underline{\underline{12,355}}$$

Freiheitsgrade: $f = 7 + 8 - 2 = 13$

Kritischer Wert t bei verschiedenen Sicherheitsgraden:

Freiheits- grad f	Statistische Sicherheit $S = 1 - \alpha/2$						
	90 %	95 %	97,5 %	99 %	99,5 %	99,9 %	99,95 %
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,930	4,318
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,852	4,221
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787	4,140

T ist somit größer als der „kritische Wert“ t bei einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ ($t_{f, 1-\alpha/2} = 2,160$) bei der entsprechenden Anzahl der Freiheitsgrade f . Somit ist das Ergebnis in diesem Fall signifikant.

Im Ergebnisteil werden jeweils die Fehlerwahrscheinlichkeiten (p-Werte) direkt angegeben.

Hierbei gilt:

- $p > 0,05$ = nicht signifikant
- $p < 0,05$ = signifikant
- $p < 0,01$ = hochsignifikant
- $p < 0,001$ = höchstsignifikant

3.23 Standardisierbarkeit

Die weiblichen oder männlichen Patienten waren zwischen 56 und 77 Jahre alt. Jegliche auffällige Vorerkrankung, außer einer Coxarthrose, führte zum Ausschluss aus dem Spenderkollektiv. Hier seien Malignome, bestehende akute oder chronische Infektionskrankheiten, endokrine und schwere kardiovaskuläre Erkrankungen genannt. Bei den Patienten wurde vor der Hüftgelenkersatzoperation eine Eigenblutspende durchgeführt, um eine serologische Testung des Patienten zu gewährleisten.

Die resezierten Hüftköpfe der Patienten mussten den Anforderungen für Knochenbanken [Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer 1996] genügen.

Im Falle der Testung von allogenen Knochenmaterial galten diese Regeln sowohl für die notwendigen Zellen der Kulturen, als auch für die Herstellung der Knochenprobenkörper.

Das positive Votum und die Genehmigung der Ethikkommission waren für die gesamte Studie bindend.

Diese Studie, sowie auch weitere Studien, die bereits in unserem Labor durchgeführt wurden, bewiesen durch ihre Ergebnisse die Standardisierbarkeit dieses Zellkulturmodells, d.h. die Ergebnisse der Kontrollkulturen sind jederzeit reproduzierbar, wenn Knochenmark von vergleichbaren Patientenpopulationen entnommen wird und die Art der Kultivierung unter gleichen Bedingungen erfolgt [Wilke et al. 1992 – 2005].

4 Ergebnisse

4.1 Kontrolle nach 12-Wochen Kultur

Innerhalb des Versuchszeitraums zeigten die humanen Knochenmarkszellen der Kontrollkulturen, d.h. Zellen die ohne Knochenproben in Petrischalen kultiviert wurden, ein stetig fortschreitendes gutes Proliferationsverhalten. Dieses Proliferationsverhalten wurde auflichtmikroskopisch verfolgt. Am Aussaatag Tag 0 der Kultur bildeten die rundlichen humanen Knochenmarkszellen unterschiedlicher Größe einen einheitlichen Zellrasen (Abb.4-1). Im Verlauf der Kultur stieg die Anzahl von Zellen, die lange Zytoplasmaausläufer bildeten und sich miteinander verbanden. Auch kam es zu sich ausbreitenden Zellkolonien oder Zellhaufen. Dieses interkonnektierende Netzwerk bedeckte die Petrischalen der Kontrollkulturen (Abb.4-1;4-2;4-3).

Weiterhin wurden im Verlauf des 12-Wochen-Versuchs aus den gesammelten Mediumüberständen verschiedenste Messungen (Zytokin-, Enzym-, pH-Wert, Lactat-, Zellzahlbestimmung) durchgeführt.

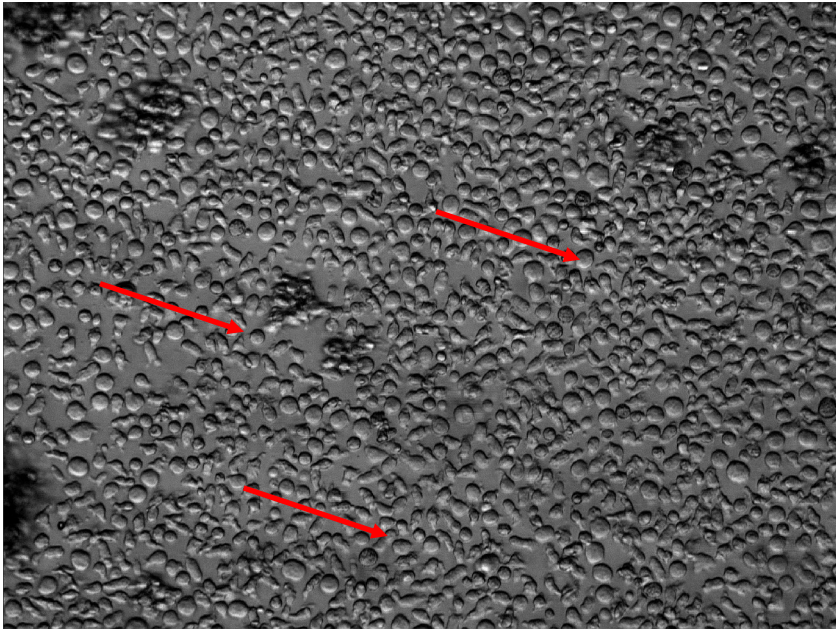


Abbildung 4-1 Auflichtmikroskopische Aufnahme einer humanen Knochenmarkszellkultur Tag 0 nach Aussaat – Vergrößerung 100x – Kontrolle ohne Probenkörper

Rundliche humane Knochenmarkszellen unterschiedlicher Größe (z.B. rote Pfeile) bilden einen Zellrasen (Monolayer). Kein Anhalt für interkonnektierende Netzwerke oder extrazelluläre Matrixbildung.

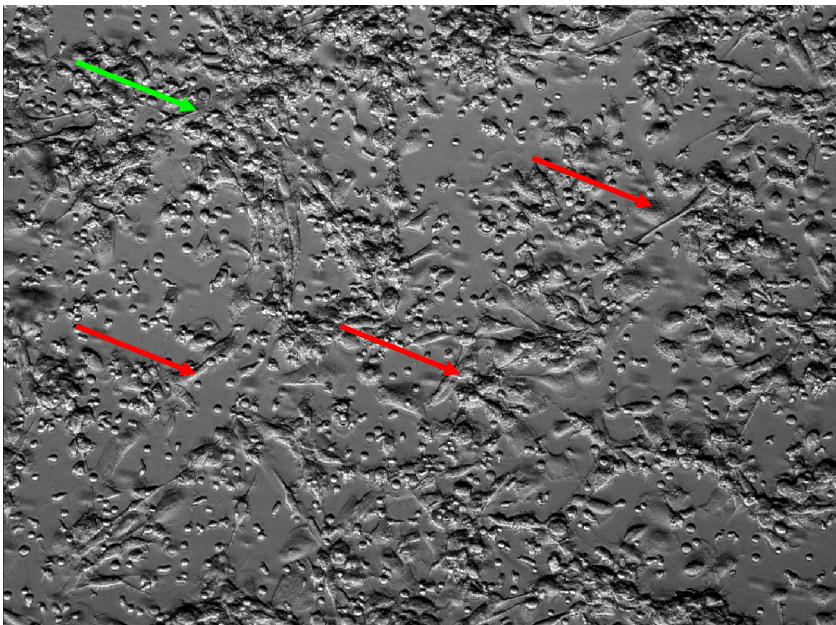


Abbildung 4-2 Auflichtmikroskopische Aufnahme einer humanen Knochenmarkszellkultur Tag 14 nach Aussaat – Vergrößerung 100x – Kontrolle ohne Probenkörper

Man erkennt, dass die humanen Knochenmarkszellen ihr einheitliches Aussehen verloren haben. Im oberen Teil des Bildausschnitts (grüner Pfeil) sieht man Zellkolonien, im unteren bilden die Zellen Zytropodien (roter Pfeile).

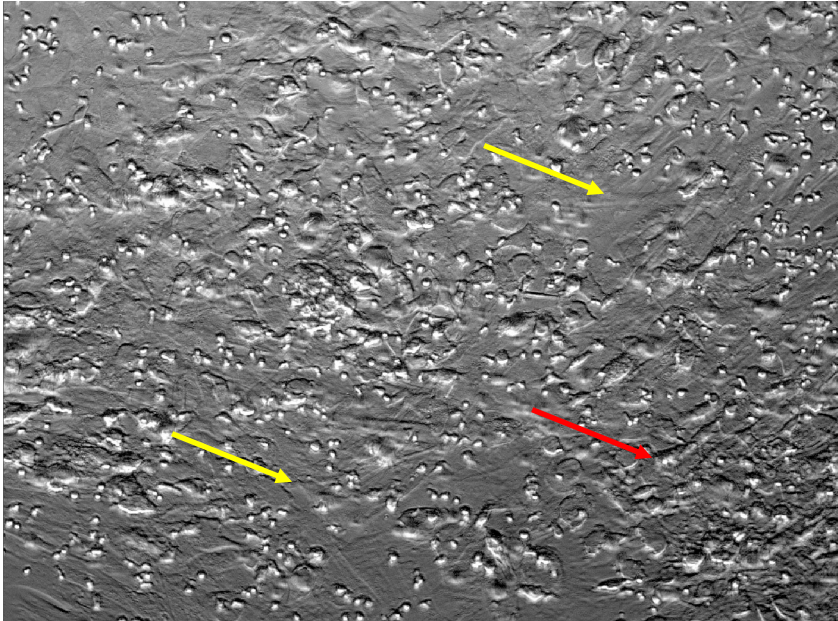


Abbildung 4-3 Auflichtmikroskopische Aufnahme einer humanen Knochenmarkszellkultur Tag 21 nach Aussaat – Vergrößerung 100x – Kontrolle ohne Probenkörper

Die humanen Knochenmarkszellen haben einen zusammenhängenden Zellrasen gebildet (gelber Pfeil). Die Zellen sind durch zahlreiche Zytopodien miteinander verbunden (interkonnektierendes Netzwerk). Es sind ebenfalls kleinere rundliche Zellen und Zellkolonien zu erkennen (roter Pfeil).

4.1.1 Zellzahlbestimmung aus dem Mediumüberstand

Um einen Eindruck über die Anzahl abgesaugter Zellen aus den Kulturen zu bekommen wurde aus jedem Mediumüberstand der Kontrollkulturen eine Zellzahlbestimmung mittels CASY®1-Zellzähler durchgeführt. Dabei wurde die Größe von 6,25-40µm als potenziell lebend gewertet. Die Kulturen zeigten zu Beginn einen Peak bei 10µm der sich im Kulturzeitraum abflachte. Der Messbereich unter 6,25µm, gewertet als avital Zellen und Zelltrümmer, nahm hingegen zu (Abb.4-4;4-5;4-6).

Exemplarische Graphenveränderung der Mediumüberstände einer humanen Knochenmarkszellkontrollkultur

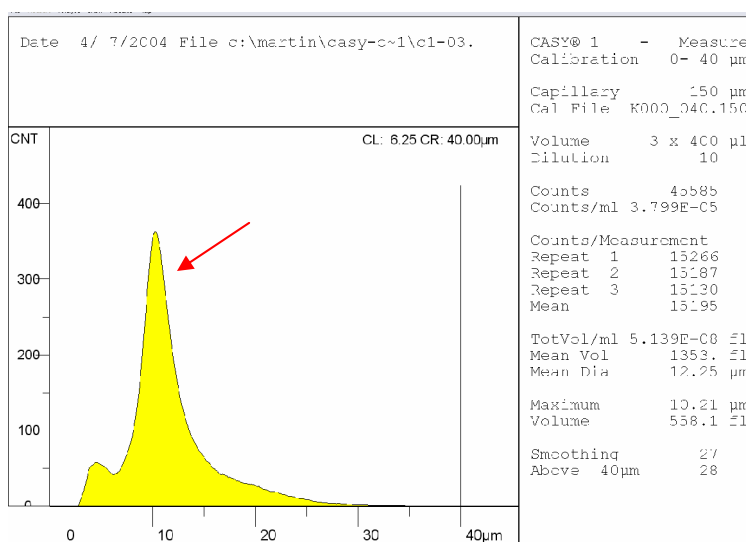


Abbildung 4-4 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkontrollkultur Tag 6 nach Aussaat

Es wurden nur die Zellen innerhalb des Größenbereiches von 6,25 µm bis 40 µm als vital gezählt.

Peakbildung bei 10µm (roter Pfeil).

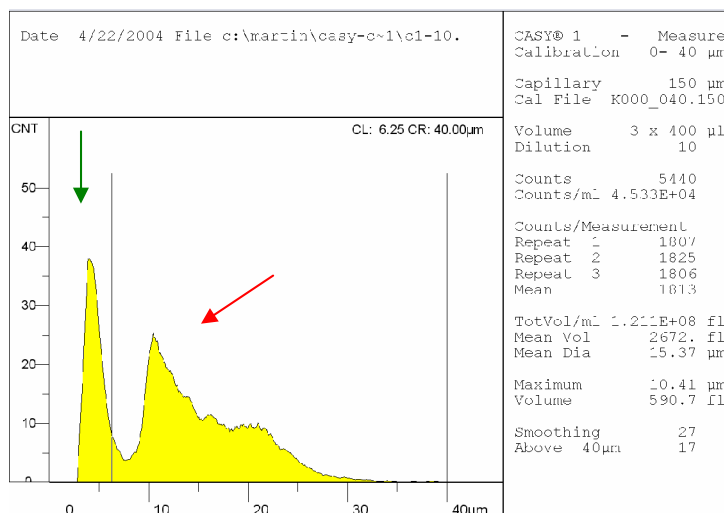


Abbildung 4-5 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkontrollkultur, Tag 20 nach Aussaat

Es wurden nur die Zellen innerhalb des Größenbereiches von 6,25 µm bis 40 µm als vital gezählt.

Abflachung des Peak bei 10µm (roter Pfeil), Zunahme der avitalen Anteile im abgesaugten Medium (<6,25 µm - grünerPfeil).

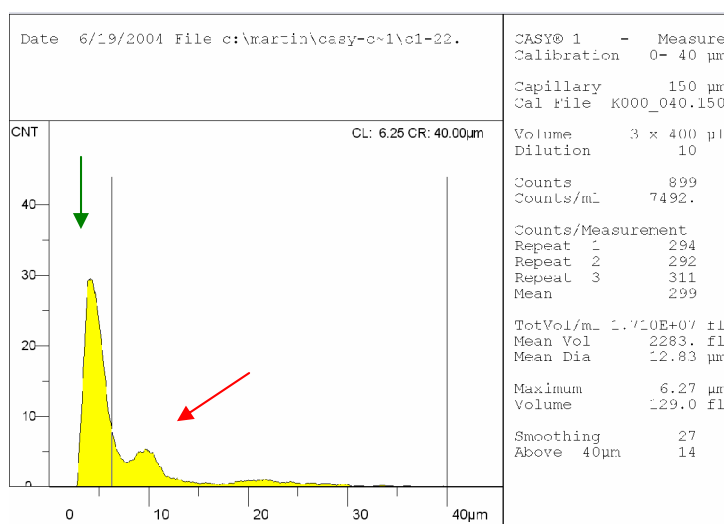


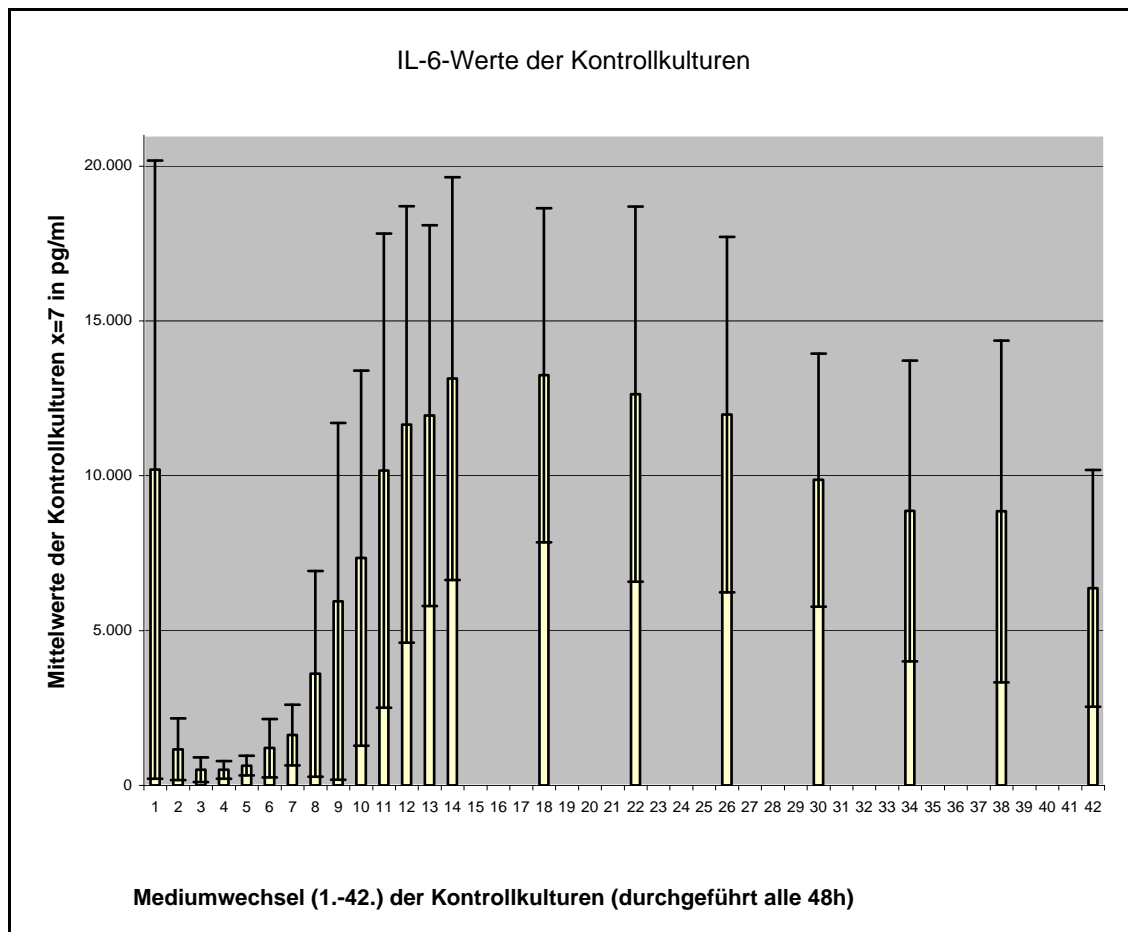
Abbildung 4-6 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkontrollkultur, Tag 66 nach Aussaat

Es wurden nur die Zellen innerhalb des Größenbereiches von 6,25 µm bis 40 µm als vital gezählt.

Abflachung des Peak bei 10µm (roter Pfeil), Zunahme der avitalen Anteile im abgesaugten Medium (<6,25 µm - grünerPfeil).

4.1.2 Zytokinprofile der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen

4.1.2.1 Zytokinprofil der Kontrollkulturen für Interleukin-6



IL-6 Werte der Kontrollkulturen

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert Zellen pg/ml	10199,5	1167,8	506,1	501,7	639,1	1201,5	1624,7
Standardabweichung	9982,8	996,4	400,3	286,0	317,5	945,3	982,6

Mediumwechsel	8	9	10	11	12	13	14
Mittelwert Zellen pg/ml	3603,5	5946,2	7340,7	10167,2	11654,2	11945,1	13142,1
Standardabweichung	3323,8	5764,5	6059,6	7660,5	7050,1	6150,2	6505,1

Mediumwechsel	18	22	26	30	34	38	42
Mittelwert Zellen pg/ml	13244,4	12635,0	11976,1	9861,1	8863,1	8847,1	6362,8
Standardabweichung	5392,6	6056,8	5740,0	4087,2	4858,3	5518,1	3826,0

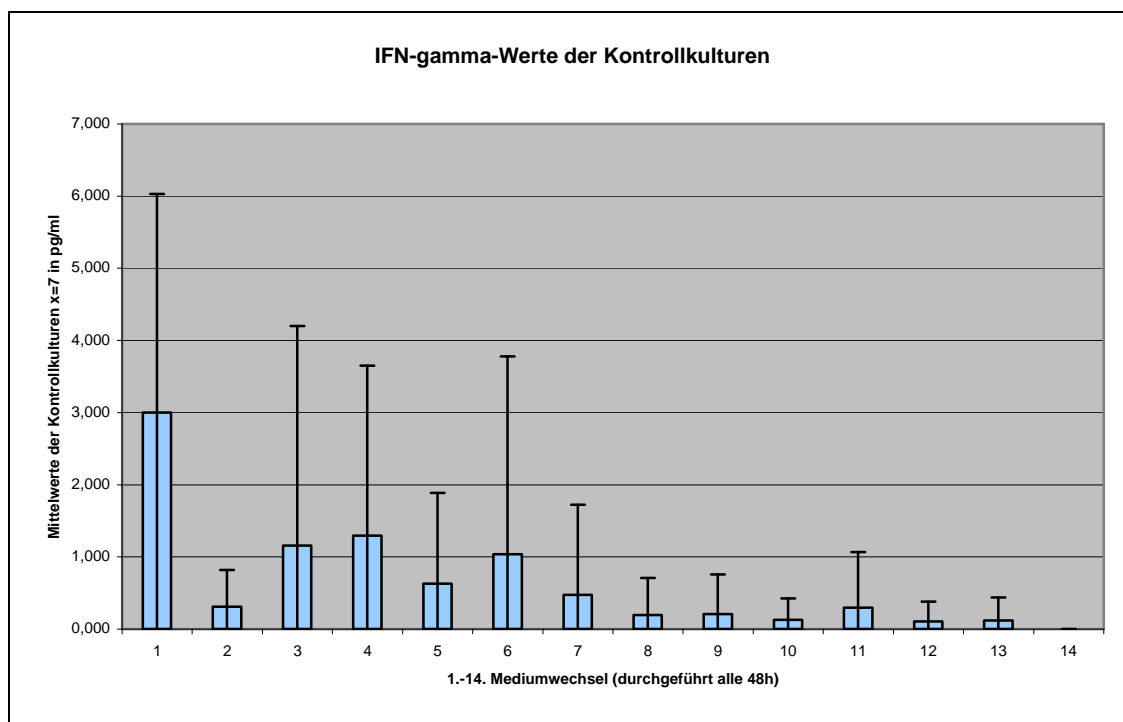
Abbildung 4-7 IL-6 Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen

Die Graphik stellt IL-6 Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen (Mittelwerte aus $x=7$ und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer (Angabe der durchgeführten

Mediumwechsel alle 48h) dar. Ab dem 14. Mediumwechsel (entspricht Tag 28 nach Aussaat) erfolgte die IL-6 Bestimmung bei jedem vierten Mediumwechsel.

Nach hohen IL-6 Werten am ersten Mediumwechsel fiel das IL-6 auf niedrige Werte ab, um dann ab dem 5. Mediumwechsel (entspricht Tag 10 nach Aussaat) wieder stetig anzusteigen. Das Maximum wurde zwischen 14. und 18. Mediumwechsel erreicht und fiel danach langsam ab. Für den verbleibenden Untersuchungszeitraum pendelte sich der Wert um ca. 10000pg/ml ein (Abb.4-7).

4.1.2.2 Zytokinprofil der Kontrollkulturen für IFN- γ



IFN- γ -Werte der Kontrollkulturen

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert Zellen pg/ml	3,00	0,31	1,16	1,30	0,63	1,04	0,47
Standardabweichung	3,03	0,51	3,04	2,35	1,26	2,74	1,25

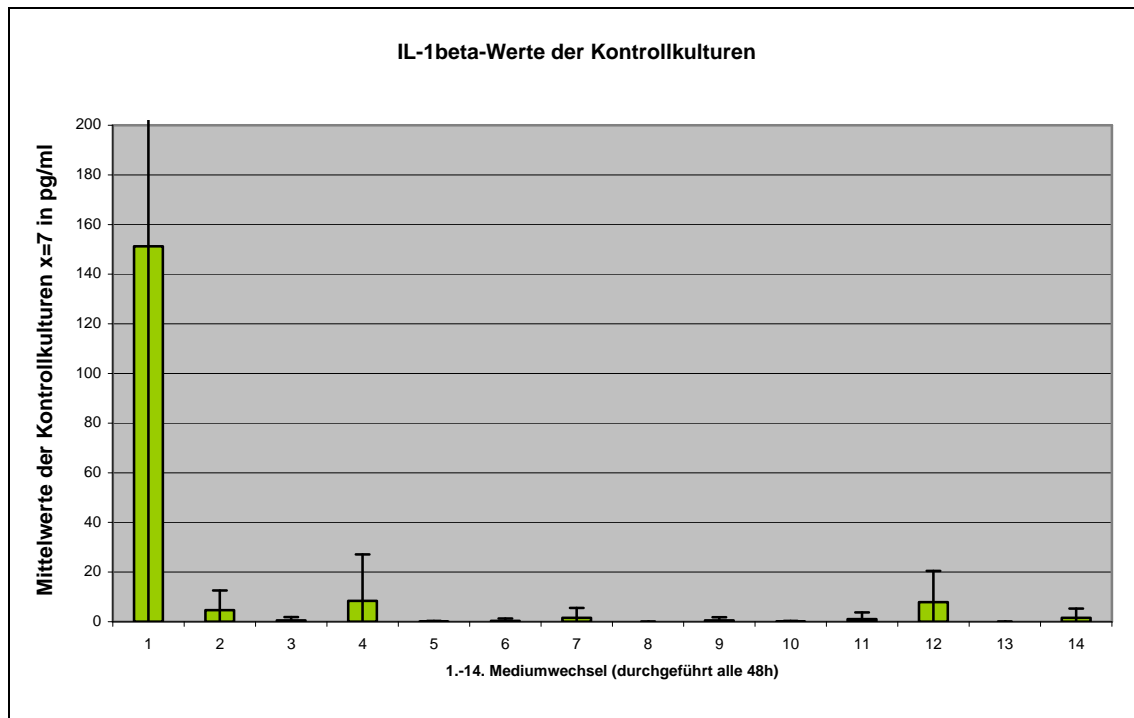
Mediumwechsel	8	9	10	11	12	13	14
Mittelwert Zellen pg/ml	0,19	0,21	0,13	0,30	0,10	0,12	0,00
Standardabweichung	0,51	0,55	0,30	0,77	0,28	0,32	0,00

Abbildung 4-8 IFN – γ Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen

Die Graphik stellt IFN – γ Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen (Mittelwerte aus $x=7$ und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer (Angabe der durchgeführten Mediumwechsel alle 48h) dar. Aufgrund der Ergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze von 5pg/ml unterbleibt die Darstellung der Ergebnisse ab dem 14. Mediumwechsel (entspricht Tag 28 nach Aussaat).

Die Werte für IFN – γ lagen über den gesamten Untersuchungszeitraum unter der Nachweisgrenze von 5pg/ml (Abb.4-8). Eine Darstellung der Ergebnisse ab dem 14. Mediumwechsel unterbleibt.

4.1.2.3 Zytokinprofil der Kontrollkulturen für Interleukin-1 β



IL-1 β -Werte der Kontrollkulturen

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert Zellen pg/ml	151,18	4,65	0,51	8,39	0,09	0,35	1,53
Standardabweichung	161,98	7,95	1,36	18,70	0,24	0,92	4,04

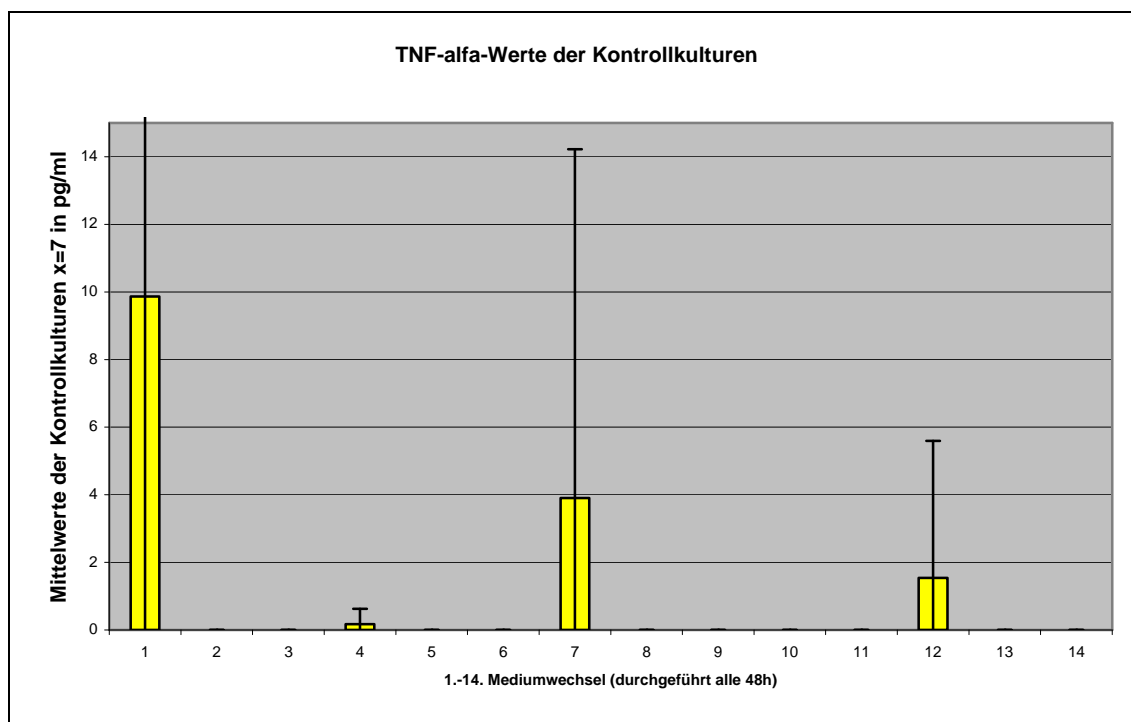
Mediumwechsel	8	9	10	11	12	13	14
Mittelwert Zellen pg/ml	0,00	0,49	0,09	1,02	7,87	0,00	1,54
Standardabweichung	0,00	1,30	0,24	2,70	12,60	0,00	3,77

Abbildung 4-9 . IL - 1 β Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen

Die Graphik stellt IL - 1 β Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen (Mittelwerte aus x=7 und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer (Angabe der durchgeführten Mediumwechsel alle 48h) dar. Aufgrund der Ergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze von 5pg/ml unterbleibt die Darstellung der Ergebnisse ab dem 14. Mediumwechsel (entspricht Tag 28 nach Aussaat)

Nur beim 1. Mediumwechsel konnte IL-1 β die Nachweisgrenze 5pg/ml überschreiten, danach lagen die Messergebnisse für den restlichen Untersuchungszeitraum unterhalb dieser Grenze (Abb.4-9). Eine Darstellung der Ergebnisse ab dem 14. Mediumwechsel unterbleibt.

4.1.2.4 Zytokinprofil der Kontrollkultur für TNF- α



TNF- α -Werte der Kontrollkulturen

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert Zellen pg/ml	9,87	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00	3,90
Standardabweichung	13,21	0,00	0,00	0,45	0,00	0,00	10,32

Mediumwechsel	8	9	10	11	12	13	14
Mittelwert Zellen pg/ml	0,00	0,00	0,00	0,00	1,53	0,00	0,00
Standardabweichung	0,00	0,00	0,00	0,00	4,06	0,00	0,00

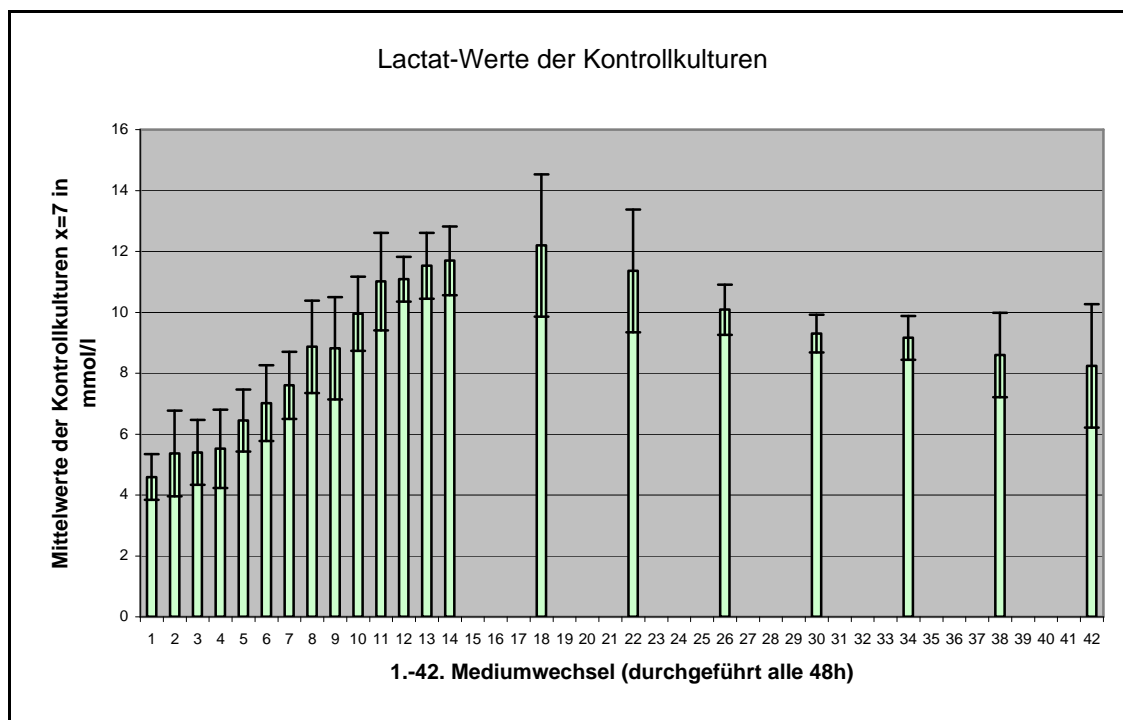
Abbildung 4-10 . TNF – α Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen

Die Graphik stellt TNF – α Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen (Mittelwerte aus $x=7$ und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer (Angabe der durchgeführten Mediumwechsel alle 48h) dar. Aufgrund der Ergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze von 5pg/ml unterbleibt die Darstellung der Ergebnisse ab dem 14. Mediumwechsel (entspricht Tag 28 nach Aussaat).

TNF – α wurde sporadisch am 1. und 7. Mediumwechsel erhöht gemessen, wurde aber ansonsten unterhalb der Nachweisgrenze von 5pg/ml (Abb. 4-10) gemessen. Die Darstellung der Ergebnisse ab dem 14. Mediumwechsel (entspricht Tag 36 nach Aussaat) sind deshalb nicht dargestellt.

4.1.3 Lactatwerte und Enzymprofil der Zellkulturen ohne behandelte Knochenprobenkörper

4.1.3.1 Profil der Lactatwerte der Kontrollkulturen



Lactat-Werte der Kontrollkulturen

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert Zellen mmol/ml	4,59	5,36	5,40	5,52	6,44	7,02	7,60
Standardabweichung	0,75	1,40	1,07	1,28	1,02	1,24	1,10

Mediumwechsel	8	9	10	11	12	13	14
Mittelwert Zellen mmol/ml	8,87	8,82	9,95	11,01	11,09	11,52	11,69
Standardabweichung	1,52	1,68	1,22	1,60	0,74	1,08	1,13

Mediumwechsel	18	22	26	30	34	38	42
Mittelwert Zellen mmol/ml	12,19	11,36	10,08	9,31	9,16	8,60	8,24
Standardabweichung	2,34	2,01	0,82	0,62	0,72	1,38	2,03

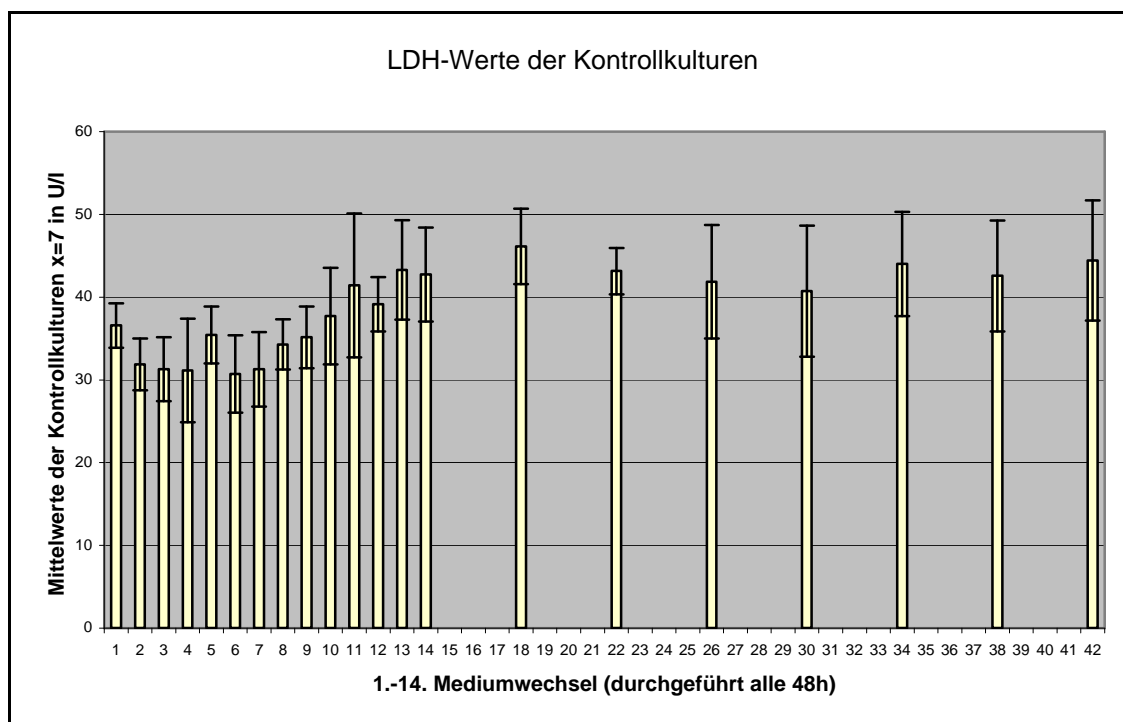
Abbildung 4-11 Lactat Werte der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen

Die Graphik stellt die Lactatwerte der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen (Mittelwerte aus $x=7$ und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer (Angabe der durchgeführten Mediumwechsel alle 48h) dar. Ab dem 14. Mediumwechsel (entspricht Tag 28 nach Aussaat) erfolgte die Lactat Bestimmungen bei jedem vierten Mediumwechsel.

Nach anfänglich niedrigen Konzentrationen an Lactat, kam es ab dem 5. Mediumwechsel (entspricht Tag 10 nach Aussaat) zu einem stetigen Ansteigen der Konzentrationen.

Das Maximum wurde am 18. Mediumwechsel (entspricht Tag 36 nach Aussaat) mit ca. 12mmol/ml bestimmt, über den weiteren Verlauf kam es zu einem Abfall der Lactat Konzentrationen auf Werte um die 9,5mmol/l (Abb.4-11).

4.1.3.2 Enzymprofil der Lactatdehydrogenase der Kontrollkulturen



LDH-Werte der Kontrollkulturen

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert Zellen U/l	36,57	31,86	31,29	31,14	35,43	30,71	31,29
Standardabweichung	2,70	3,13	3,86	6,26	3,46	4,68	4,50

Mediumwechsel	8	9	10	11	12	13	14
Mittelwert Zellen U/l	34,29	35,14	37,71	41,43	39,14	43,29	42,71
Standardabweichung	3,04	3,72	5,82	8,70	3,29	6,02	5,68

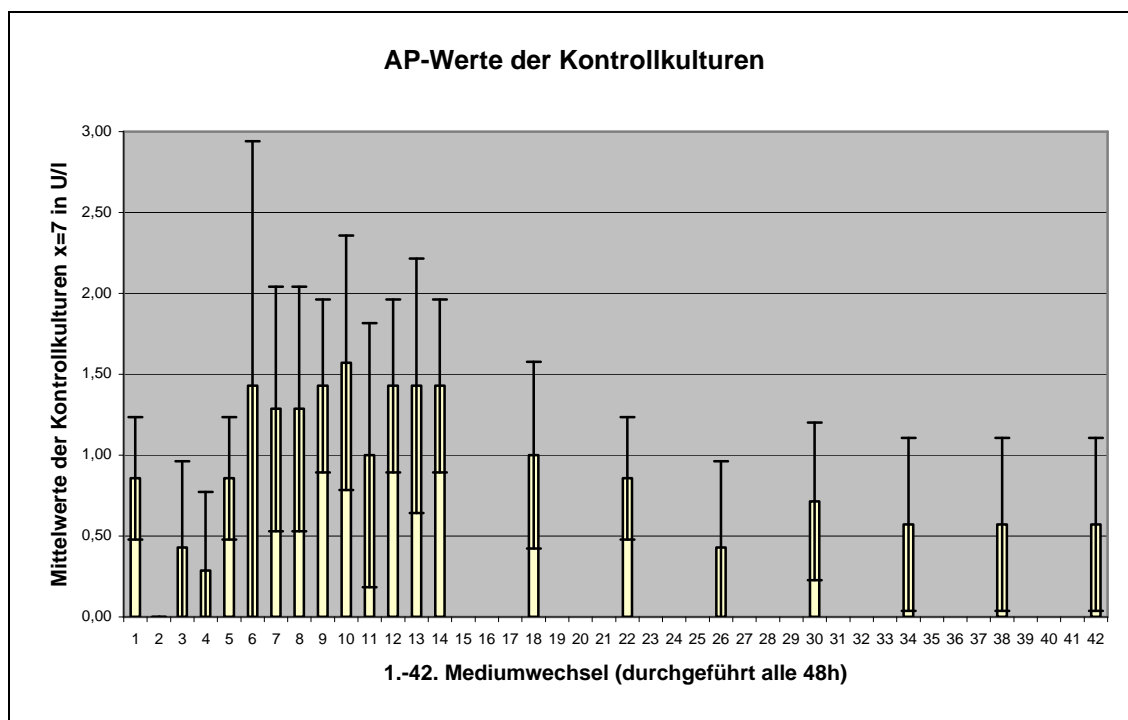
Mediumwechsel	18	22	26	30	34	38	42
Mittelwert Zellen U/l	46,14	43,14	41,86	40,71	44,00	42,57	44,43
Standardabweichung	4,56	2,79	6,87	7,93	6,30	6,70	7,28

Abbildung 4-12 . LDH Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen

Die Graphik stellt die LDH-Werte der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen (Mittelwerte aus $x=7$ und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer (Angabe der durchgeführten Mediumwechsel alle 48h) dar. Ab dem 14. Mediumwechsel (entspricht Tag 28 nach Aussaat) erfolgten die LDH-Bestimmungen bei jedem vierten Mediumwechsel.

Wie in der obigen Graphik und Tabelle dargestellt (Abb.4-12) blieb die LDH Freisetzung der Kontrollkulturen über den gesamten Untersuchungszeitraum relativ gleich bleibend, bei Werten um die 38U/l.

4.1.3.3 Enzymprofil der Alkalischen Phosphatase der Kontrollkulturen



AP-Werte der Kontrollkulturen

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert Zellen U/l	0,86	0,00	0,43	0,29	0,86	1,43	1,29
Standardabweichung	0,38	0,00	0,53	0,49	0,38	1,51	0,76

Mediumwechsel	8	9	10	11	12	13	14
Mittelwert Zellen U/l	1,29	1,43	1,57	1,00	1,43	1,43	1,43
Standardabweichung	0,76	0,53	0,79	0,82	0,53	0,79	0,53

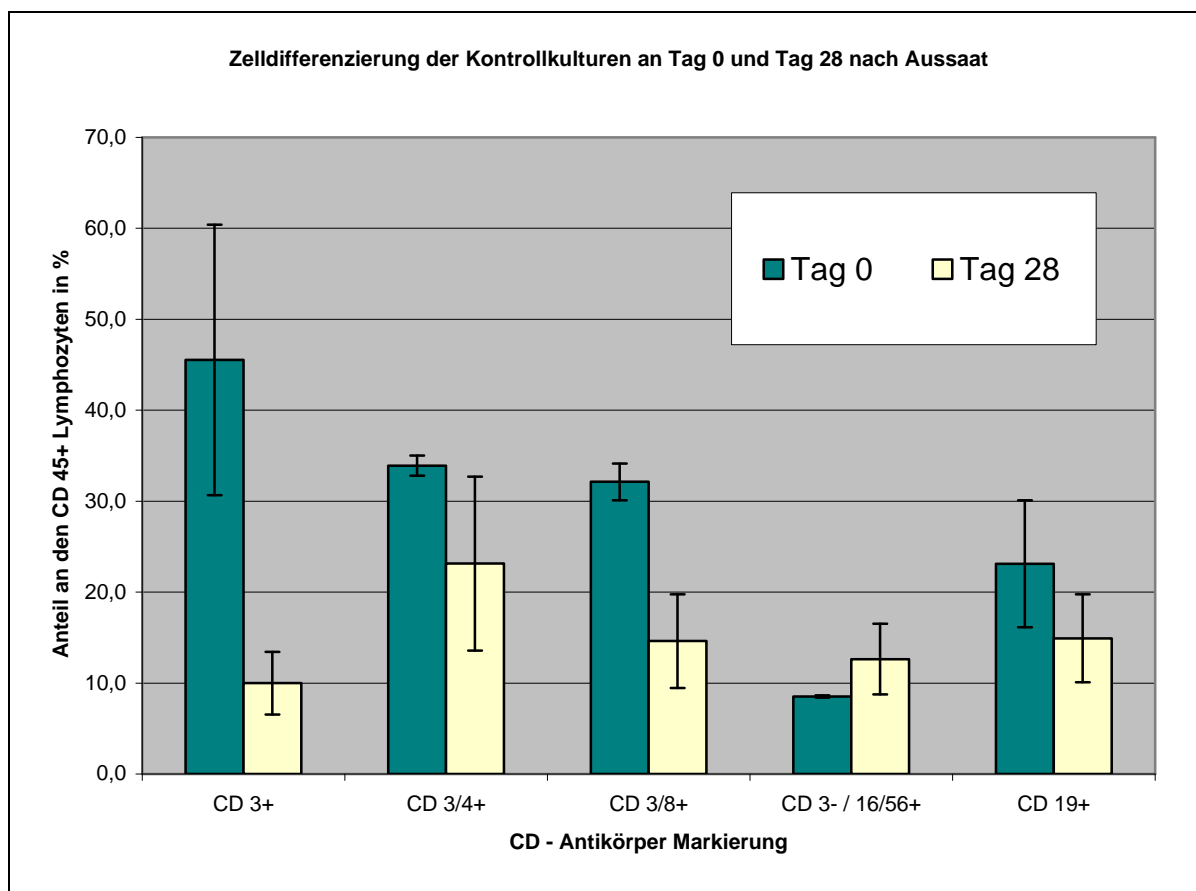
Mediumwechsel	18	22	26	30	34	38	42
Mittelwert Zellen U/l	1,00	0,86	0,43	0,71	0,57	0,57	0,57
Standardabweichung	0,58	0,38	0,53	0,49	0,53	0,53	0,53

Abbildung 4-13 Freisetzung der alkalischen Phosphatase der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen

Die Graphik stellt die Werte der alkalischen Phosphatase der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen (Mittelwerte aus $x=7$ und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer (Angabe der durchgeführten Mediumwechsel alle 48h) dar. Ab dem 14. Mediumwechsel (entspricht Tag 28 nach Aussaat) erfolgte die AP-Bestimmungen bei jedem vierten Mediumwechsel

Über den gesamten Untersuchungszeitraum konnte zwar die AP bestimmt werden, doch lagen die Werte immer unter der Grenze von 5U/l, wie in den obigen Tabellen und Graphiken zu sehen (Abb. 4-13).

4.1.4 FACS der Kontrollkulturen



Zelldifferenzierung der Kontrollkulturen an Tag 0 und Tag 28 nach Aussaat

		prozentualer Anteil der CD - markierten Subpopulation an den CD 45+ Lymphozyten				
		CD 3+	CD 3+ / 4+	CD 3+ / 8+	CD 3- / 16+ / 56+	CD 19+
Kontrollkultur Tag 0	Mittelwert	45,52	33,90	32,12	8,53	23,12
	Standardabw.	14,87	1,10	2,02	0,12	6,98
Kontrollkultur Tag 28	Mittelwert	10,00	23,12	14,61	12,64	14,92
	Standardabw.	3,45	9,56	5,16	3,87	4,84
T - Test		p < 0,001	p > 0,05	p < 0,01	p > 0,05	p > 0,05

Abbildung 4-14 Darstellung der FACS-Analysen an Tag 0 und Tag 28 nach Aussaat

Tabelle und Graphik stellen den prozentualen Anteil der Subpopulation (x-Achse zeigt die Kombination der jeweiligen CD-Antikörper) an der Gesamtpopulation der CD 45⁺ Lymphozyten (y-Achse) dar.

Mittelwerte $x=5$.

CD3 ⁺	:	reife T-Zelle
CD3/4 ⁺	:	T-Helfer-Zelle
CD3/8 ⁺	:	Suppressor-/ Zytotoxische T-Zellen
CD3 ⁻ /16 ⁺ /56 ⁺	:	NKZ, natürliche-Killer-Zellen
CD19 ⁺	:	B-Zelle

Die obige Grapik und Tabelle (Abb.4-14) zeigen die Zellzusammensetzungen der Kontrollkulturen an Tag 0 und Tag 28 nach Aussaat anhand der Zelloberflächenantigene. Die Mittelwerte errechnen sich aus $x=5$. Abgebildet sind der prozentuale Anteil der phänotypisch bestimmten Subpopulationen aller CD45⁺-Zellen (Lymphozyten). Zur Auswertung wurden jeweils 10.000 Events innerhalb der CD45⁺-Zellpopulation gewertet.

Im Vergleich der beiden FACS-Analysen war eine anteilmäßige Zunahme von natürlichen-Killer-Zellen auffallend, alle anderen Zellsubpopulationen zeigten eine Abnahme der prozentualen Anteile.

Bei der Berechnung der Signifikanz errechneten sich diese Unterschiede in den Kontrollkulturen zwischen Tag 0 und Tag 28 nach Aussaat jedoch nur für die reifen T-Zellen (CD3⁺) höchstsignifikant ($p<0,001$) und für Suppressor-/ Zytotoxische T-Zellen (CD3/8⁺) hochsignifikant ($p<0,01$). Bei allen anderen Subpopulationen errechneten sich nicht signifikante ($p>0,05$) Unterschiede.

4.2 Humane Knochenmarkszellkulturen auf behandelten Knochenproben

4.2.1 Humane Knochenmarkszellkulturen kultiviert auf 121°C autoklavierten Knochenproben

Die humanen Knochenmarkszellkulturen kultiviert auf 121°C behandelten autoklavierten Knochenproben zeigten sowohl im 4-wöchigen, als auch im 12-wöchigen Versuchsansatz ein gutes Proliferationsverhalten.

Dieses Proliferationsverhalten wurde auflichtmikroskopisch verfolgt (Abb.4-15;4-16). Im Verlauf der Kultur stieg die Anzahl von Zellen, die lange Zytoplasmaausläufer bildeten und sich miteinander verbanden (Abb.4-15).

Auch kam es zu Ansammlungen von Zellen in der Nähe der 121°C behandelten autoklavierten Knochenproben (Abb.4-16). Das sich bildende interkonnektierende Netzwerk begann die Knochenproben (Abb.4-16) zu umschließen und bildete im weiteren Verlauf einen Layer, der die Petrischale vollständig bedeckte.

Weiterhin wurden im Verlauf des 12-Wochen-Versuchs aus den gesammelten Mediumüberständen verschiedenste Messungen (Zytokin-, Enzym-, pH-Wert, Lactat-, Zellzahlbestimmung) durchgeführt.

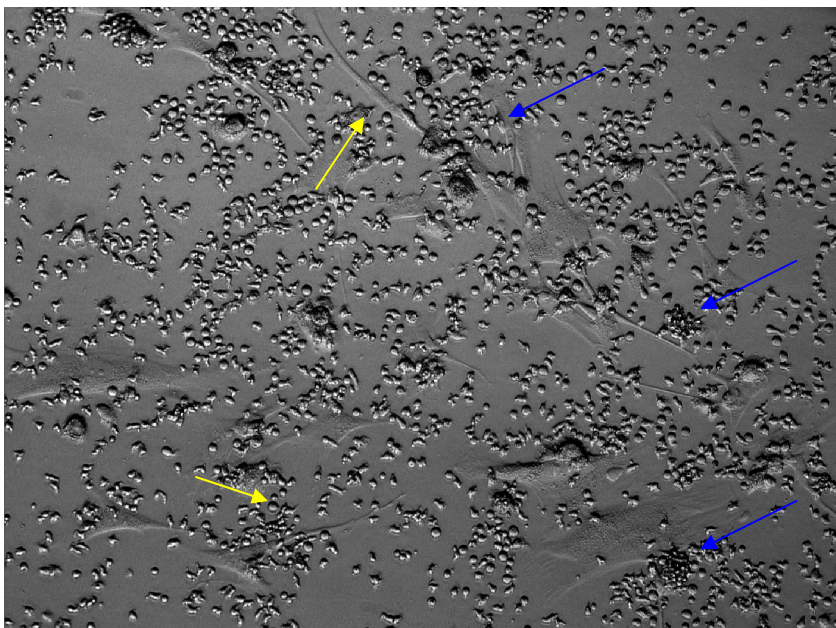


Abbildung 4-15 Auflichtmikroskopische Aufnahme einer humanen Knochenmarkszellkultur mit Knochenproben „autoklaviert 121°C“ Tag 7 nach Aussaat – Vergrößerung 100x

Die humanen Knochenmarkszellen bilden Zytopodien (gelbe Pfeile) aus, weiterhin kann man kleinere Zellhaufen und Zellkolonien erkennen (blaue Pfeile).

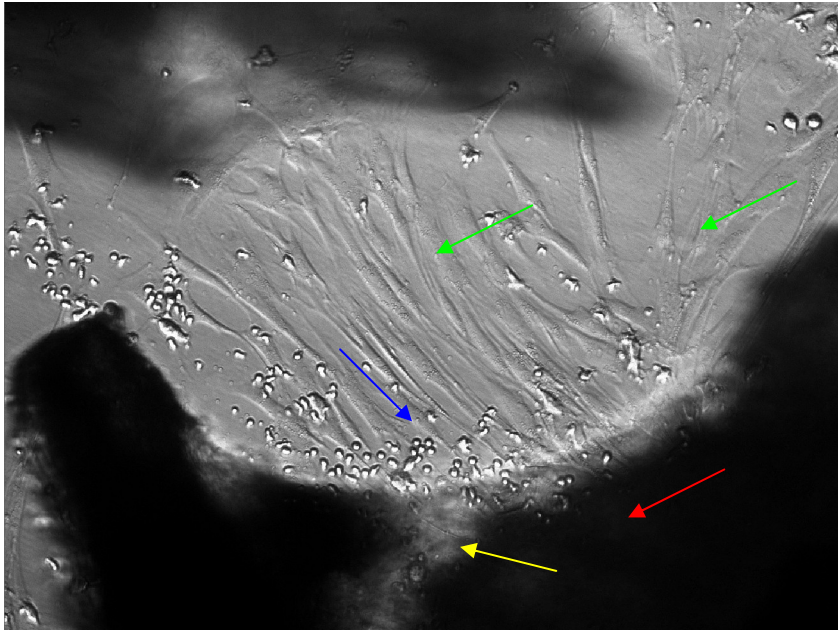


Abbildung 4-16 Auflichtmikroskopische Aufnahme einer humanen Knochenmarkszellkultur mit Knochenproben „autoklaviert 121°C“ Tag 21 nach Aussaat – Vergrößerung 100x

Die autoklavierte Knochenprobe (roter Pfeil) wird von sich bildenden interkonnektierenden Netzwerken umschlossen. Man erkennt lang ausgezogene Zellen (grüner Pfeil). Auch kommt es zu Zellhaufen in der Nähe der Knochenproben (blauer Pfeil).

Man erkennt Zellen, die in die Knochenspalten einwachsen (gelber Pfeil).

4.2.2 Humane Knochenmarkszellkulturen kultiviert auf 25kGy γ -bestrahlten Knochenproben

Die humanen Knochenmarkszellkulturen die auf 25kGy γ -bestrahlten Knochenproben kultiviert wurden, zeigten sowohl im 4-wöchigen, als auch im 12-wöchigen Versuchsansatz ein im Vergleich zu 121°C autoklavierten Kulturen schlechteres Proliferationsverhalten. Mikroskopisch zeigten sich verminderte Zellzahlen und eine schlechtere Adhärenz der humanen Knochenmarkszellen in den auflichtmikroskopisch überwachten Kulturen. Ein vollständiger Zellrasen war während des ganzen Versuchsansatzes nicht feststellbar. Ab Tag 14 nach Aussaat konnten vereinzelte Zelladhärenzen und Zytopodienbildung am Wellboden beobachtet werden (Abb.4-17). Weiterhin wurden im Verlauf des 12-Wochen-Versuchs aus den gesammelten Mediumüberständen verschiedenste Messungen (Zytokin-, Enzym-, pH-Wert, Lactat-, Zellzahlbestimmung) durchgeführt.

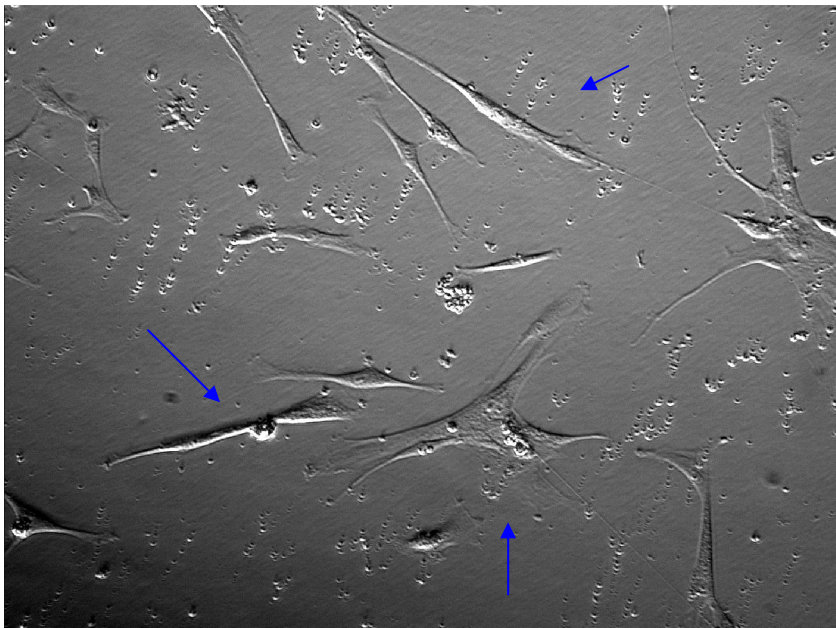
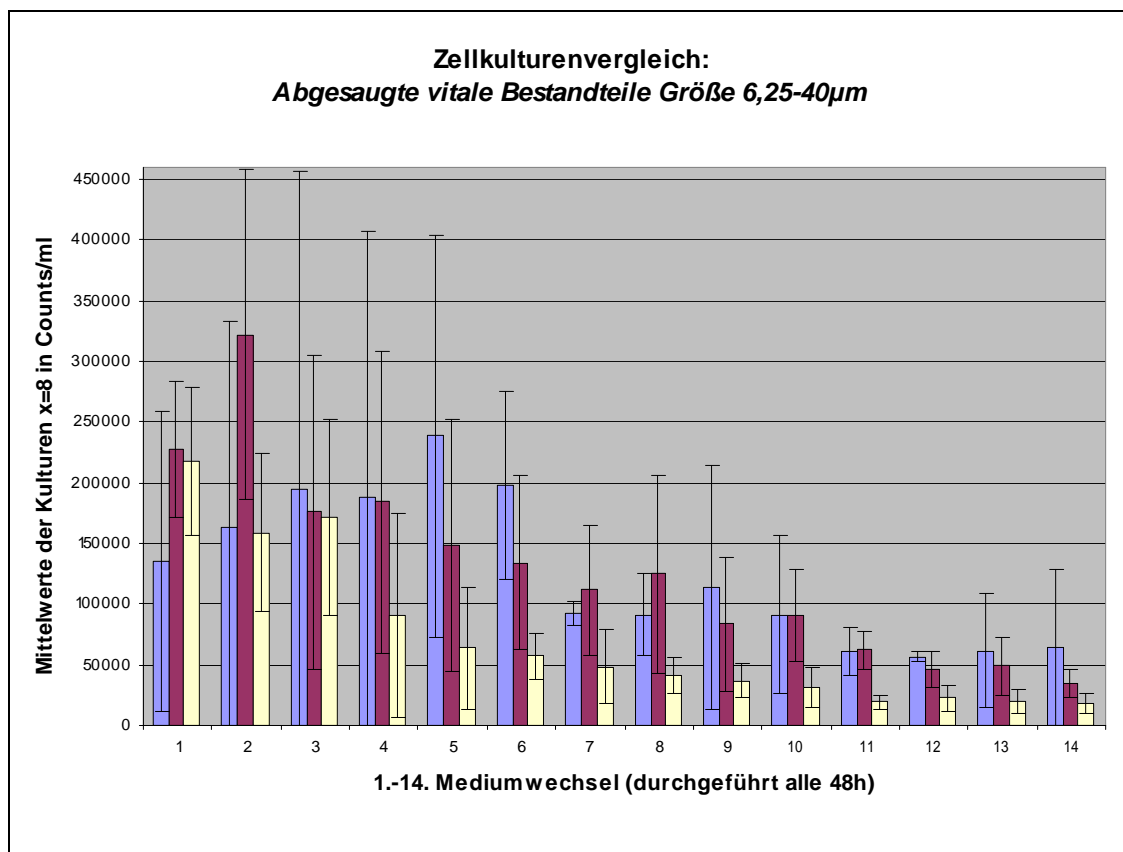


Abbildung 4-17 Auflichtmikroskopische Aufnahme einer humanen Knochenmarkszellkultur mit Knochenproben „ γ -bestrahlte 25kGy“ Tag 14 nach Aussaat – Vergrößerung 100x

Man erkennt vereinzelte langgezogene Zellen mit Ausläufern (blaue Pfeile). Auffällig die verminderte Zellanzahl

4.2.3 Zellzahlbestimmungen aus den Mediumüberständen der verschiedenen Kulturen



Zellkulturvergleich: Abgesaugte Anteile Größe 6,25-40µm in Counts/ml

Mediumwechsel (alle 48h)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kontrollkulturen	135400	162890	195090	187723	238700	197800	91970	90860	113595	91315	60880	56455
Stabw	123461	169578	261361	219451	165604	76933	10295	33715	100275	65033	20011	4470
Kulturen "121° autoklaviert"	227025	321800	175968	183851	148223	134271	111893	124809	83455	90943	61948	46658
Stabw	55875	135970	129254	123894	103723	71051	53419	82084	55123	38367	15089	14551
Kulturen "25kGy γ-bestrahlt"	218025	158825	171971	91024	63725	57279	48025	41376	36555	31245	19089	22796
Stabw	61120	65632	80533	83669	50215	19306	30619	14300	13797	16623	6333	10533

Abbildung 4-18 Zellzahlbestimmungen aus den abgesaugten Mediumüberständen der Kulturen

Kontrollkulturenhellblau

Kulturen autoklaviert 121°C..... lila

Kulturen γ-bestrahlt 25kGy..... gelb

Mittelwerte und Standardabweichung berechnen sich aus $x=8$

Um einen Eindruck über die Anzahl abgesaugter Zellen aus den verschiedenen Kulturen zu bekommen wurden an den Mediumwechseln (1.-14.), d.h. bis Tag 28 nach Aussaat,

aus den Mediumüberständen Zellzahlbestimmungen mittels CASY®1-Zellzähler durchgeführt. Dabei wurde die Größe von 6,25-40µm als vital gewertet. Counts unter 6,25µm wurden als avital gewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte ($\bar{x}=8$) und die Standardabweichungen je Verfahren (Abb.4-18).

Die verschiedenen humanen Knochenmarkszellkulturen zeigten Unterschiede bei den durchgeführten Zellzahlbestimmungen. Beim ersten Mediumwechsel lagen die Werte der Kulturen „γ-bestrahlt 25kGy“ und der Kulturen „autoklaviert 121°C“ relativ gleich um 220000 Counts/ml, die Kontrollkulturen hingegen, lagen an diesem Mediumwechsel bei rund 140000 Counts. Beim zweiten Mediumwechsel erreichten die Kulturen „autoklaviert 121°C“ ihr Maximum von ca. 320000 Counts und verhielten sich hierauf bei den folgenden Mediumwechseln den Kontrollkulturen ähnlich. Die abgesaugten Zellen der Kulturen „γ-bestrahlt 25kGy“ fielen im weiteren Verlauf der Untersuchung rapide ab und lagen unterhalb der Counts der Kontrollkulturen und der Kulturen „autoklaviert 121°C“.

4.2.4 Exemplarische Graphenveränderung der Mediumüberstände der humanen Knochenmarkszellkulturen auf behandelten Knochenproben

4.2.4.1 Kultur: Zellen kultiviert auf 121°C autoklavierten Knochenproben

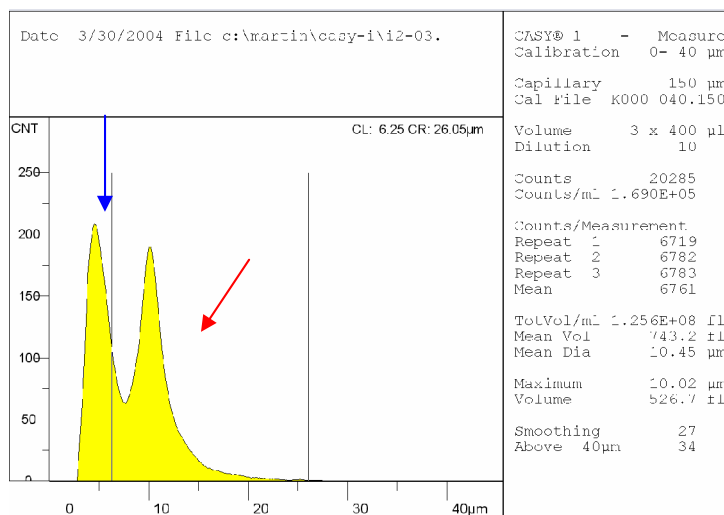


Abbildung 4-19 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkultur auf 121°C autoklavierten Knochenproben, Tag 6 nach Aussaat

Es stellt sich neben dem erwarteten Peak von abgesaugten, vitalen Zellen (um 10µm –roter Pfeil), ein zweiter Peak im avitalen Bereich (<6,25µm – blauer Pfeil) dar.

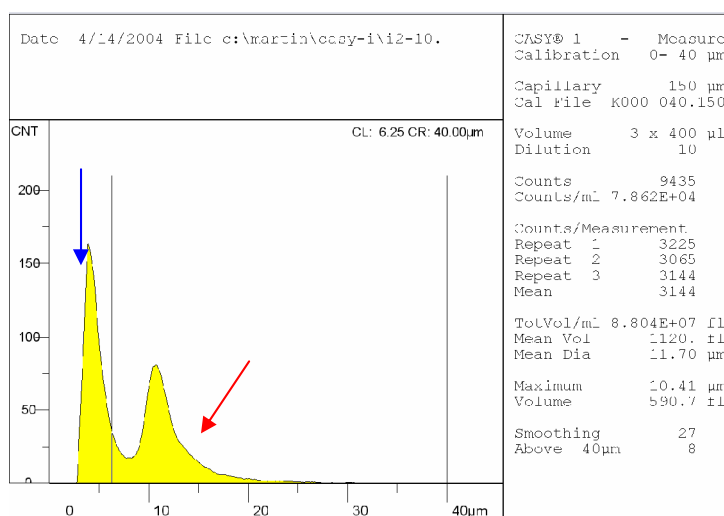


Abbildung 4-20 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkultur auf 121°C autoklavierten Knochenproben, Tag 20 nach Aussaat

Der Peak von abgesaugten, vitalen Zellen (um 10µm –roter Pfeil) wird im Verlauf der Kultur kleiner. Vermutlich durch die Adhärenz der Zellen werden weniger Zellen abgesaugt. Der zweite Peak im avitalen Bereich (<6,25µm –blauer Pfeil) ändert sich nur gering.

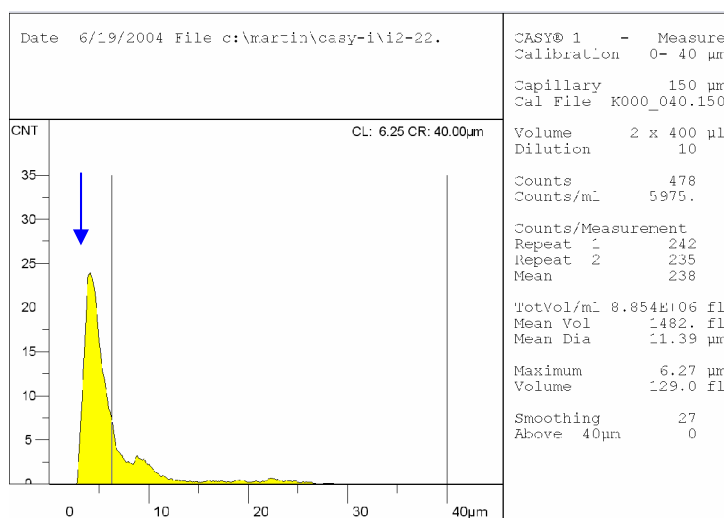


Abbildung 4-21 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkultur auf 121°C autoklavierten Knochenproben, Tag 44 nach Aussaat

Es zeigt sich lediglich ein Peak im avitalen Bereich (<6,25µm – blauer Pfeil), es werden nur geringe Mengen vitaler Zellen abgesaugt.

CASY® - Ergebnisse aus dem Medium humaner Knochenmarkszellkulturen kultiviert auf 121°C autoklavierten Knochenproben

Wie in der Kontrollkultur ließ sich am 3. Mediumwechsel (entspricht Tag 6 nach Aussaat) ein Peak von vitalen Zellen um 10µm feststellen, auffallend war ein zweiter Peak im Trümmerbereich < 6,22µm (z.B. Abb. 4-18). Über den Untersuchungszeitraum verkleinerte sich der Peak bei 10µm, d.h. die Anzahl vital gewerteter Counts/ml wurde geringer. Der Peak im avitalen Bereich veränderte sich nur gering, wurde im weiteren Verlauf der Kulturen kleiner, war aber immer messbar (z.B. Abb.4-19;4-20;4-21).

4.2.4.2 Kultur: Zellen kultiviert auf 25 kGy γ -bestrahlten Knochenproben

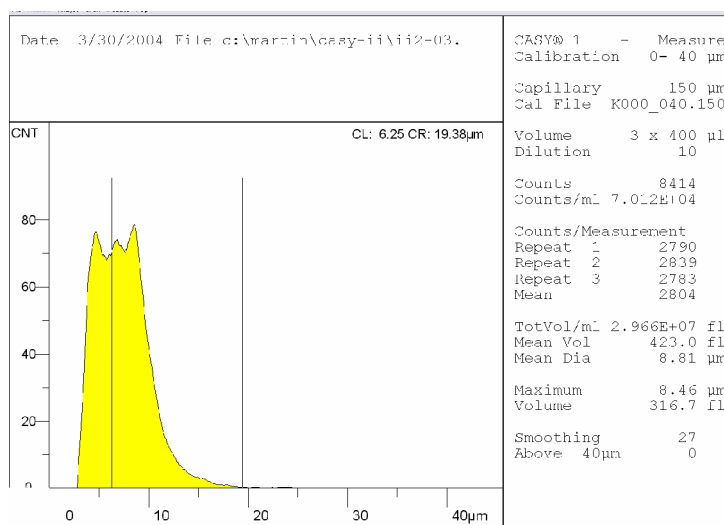


Abbildung 4-22 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkultur auf 25kGy γ -bestrahlten Knochenproben, Tag 6 nach Aussaat

Es sind überwiegend avitale Zellen bzw. Zellfragmente im Mediumüberstand zu finden.

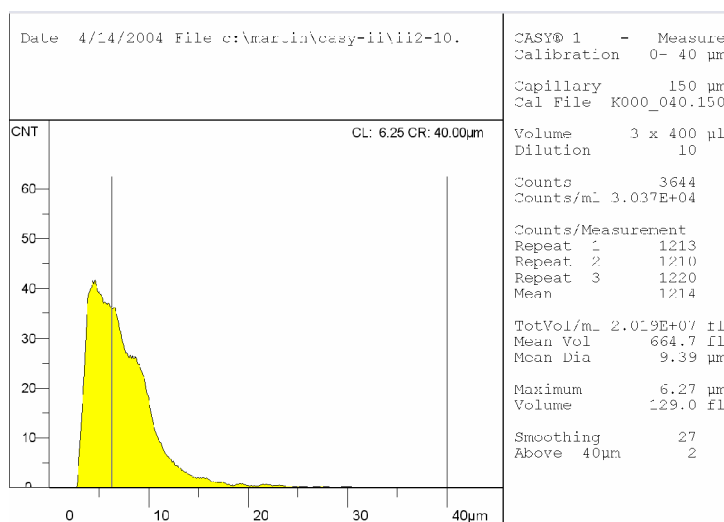


Abbildung 4-23 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkultur auf 25kGy γ -bestrahlten Knochenproben, Tag 20 nach Aussaat

Im weiteren Verlauf avitale Zellen bzw. Zellfragmente im Mediumüberstand.

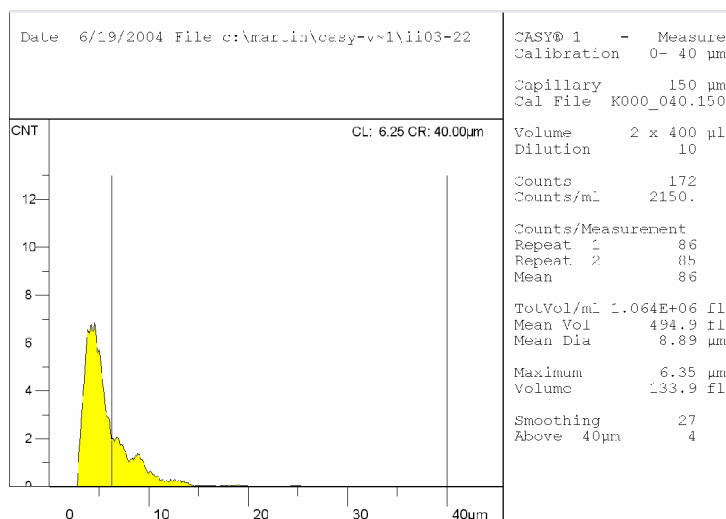


Abbildung 4-24 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkultur auf 25kGy γ -bestrahlten Knochenproben, Tag 44 nach Aussaat

Avitale Zellen und Zellfragmente im Mediumüberstand.

CASY® - Ergebnisse aus dem Medium humaner Knochenmarkszellkulturen auf 25kGy γ -bestrahlten Knochenproben

In den Kulturen mit 25kGy γ -bestrahlten Knochenproben ließen keine signifikanten Peaks nachweisen. Eine Peakbildung bei 10µm, wie in den anderen Kontrollgruppen konnte nicht nachgewiesen werden. Eine entscheidende Veränderung des Graphen im Sinne einer Peakveränderung konnte auch nicht beobachtet werden. Die Maxima der Größenverteilung lagen über dem gesamten Untersuchungszeitraum unterhalb der Größe 6,25µm (Abb.4-22;4-23;4-24)

4.2.5 Vitalitätsbestimmung mit der Trypanblaufärbung

Im Rahmen einer Trypanblauauswertung wurden die vitalen Zellen der humanen Knochenmarkszellkulturen mit behandelten Knochenproben 28 Tage nach Aussaat in der Neubauer Zählammer ausgezählt (Mittelwerte aus $x=4$).

Diese Auswertung wurde ebenfalls bei den humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen durchgeführt (Abb.4-25).

Ausgangswert war die Trypanblauauswertung humaner Knochenmarkszellkulturen am Tag 0 nach Aussaat. Hier wurde eine Vitalität von ~92% der vorhandenen Zellen in diesen Kulturen bestimmt.

Kontrollkulturen		121°C autoklaviert		25kGy γ -bestrahlt	
A	85,0%	I	69,5%	II	32,8%
B	87,1%	III	64,9%	IV	33,9%
C	84,6%	V	62,2%	VI	40,6%
D	81,7%	VII	70,2%	VIII	35,8%
Mittelwert $x=4$	84,6%	Mittelwert $x=4$	66,7%	Mittelwert $x=4$	35,8%

Abbildung 4-25 Mittelwertberechnung $x=4$ der Trypanblauauswertung der Kulturen, Tag 28 nach Aussaat

Am Tag der Auswertung (entspricht Tag 28 nach Aussaat) zeigten die Kontrollkulturen eine durchschnittliche Vitalität von 84,6% ($x=4$). Die Kulturen mit Kulturen mit 25kGy γ -bestrahlten Knochenproben zeigten die schlechteste Vitalität mit nur 35,8% ($x=4$). Die Kulturen mit 121°C autoklavierten Knochenproben zeigten 28 Tage nach Aussaat eine Vitälität von 66,7% ($x=4$).

Jedoch sind diese Ergebnisse relativ zu sehen, da Zellen die aus dem Matrixverbund nicht gelöst werden konnten, der Trypanblauauswertung in der Neubauer Zählkammer entgingen.

4.2.6 Direktfärbung der Spongiosascheiben mit Trypanblau

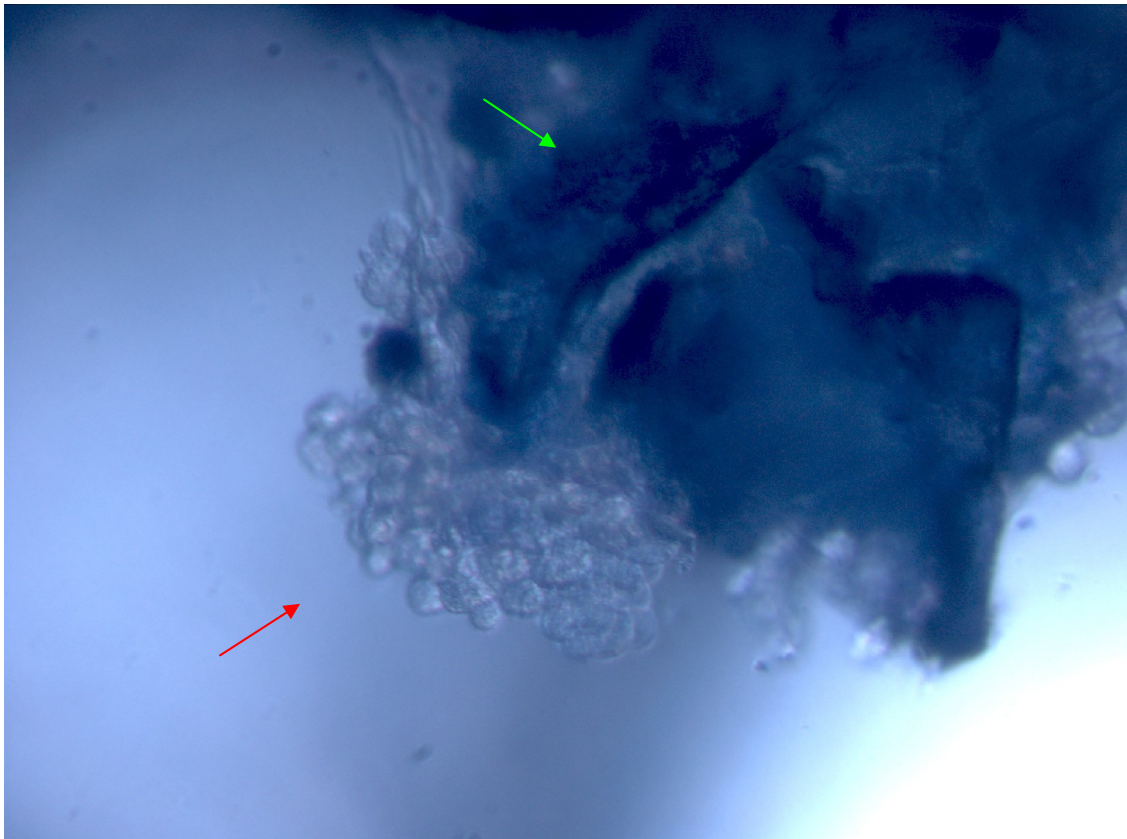


Abbildung 4-26 Spongiosascheibe „autoklaviert 121°C“ mit vitalen Zellen, 28 Tage nach Aussaat, auflichtmikroskopisch, Vergrößerung 100x, Direktfärbung Trypanblau

Nach Zelllösung mit Accutase® zeigen sich noch verbliebene, adhärenente vitale Zellen (roter Pfeil) auf den behandelten Knochenproben (grüner Pfeil). Diese Zellen entgingen der Zellzählung in der Neubauerzählkammer.

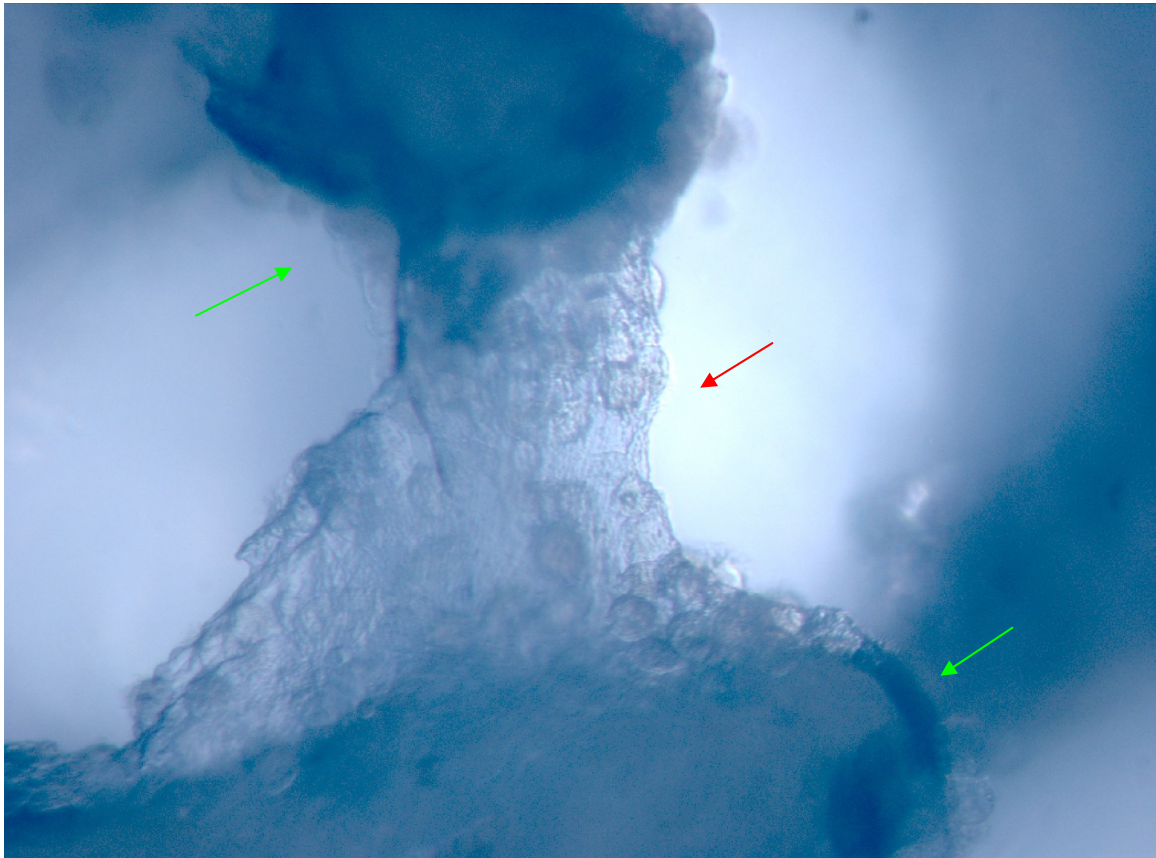


Abbildung 4-27 Spongiosascheiben „autoklaviert 121°C“ mit Zellbrücke vitaler Zellen, 28 Tage nach Aussaat, auflichtmikroskopisch, Vergrößerung 100x, Direktfärbung Trypanblau

Zwischen den Trabekeln der Spongiosascheiben „autoklaviert 121°C“ (grüne Pfeile) bilden die vitalen Zellen (roter Pfeil) durch ihre Zytopodien Zellbrücken aus. Diese Zellen konnten durch Accutase® nicht aus dem Matrixverband gelöst werden und entgingen der Zellzählung in der Neubauerzählkammer.

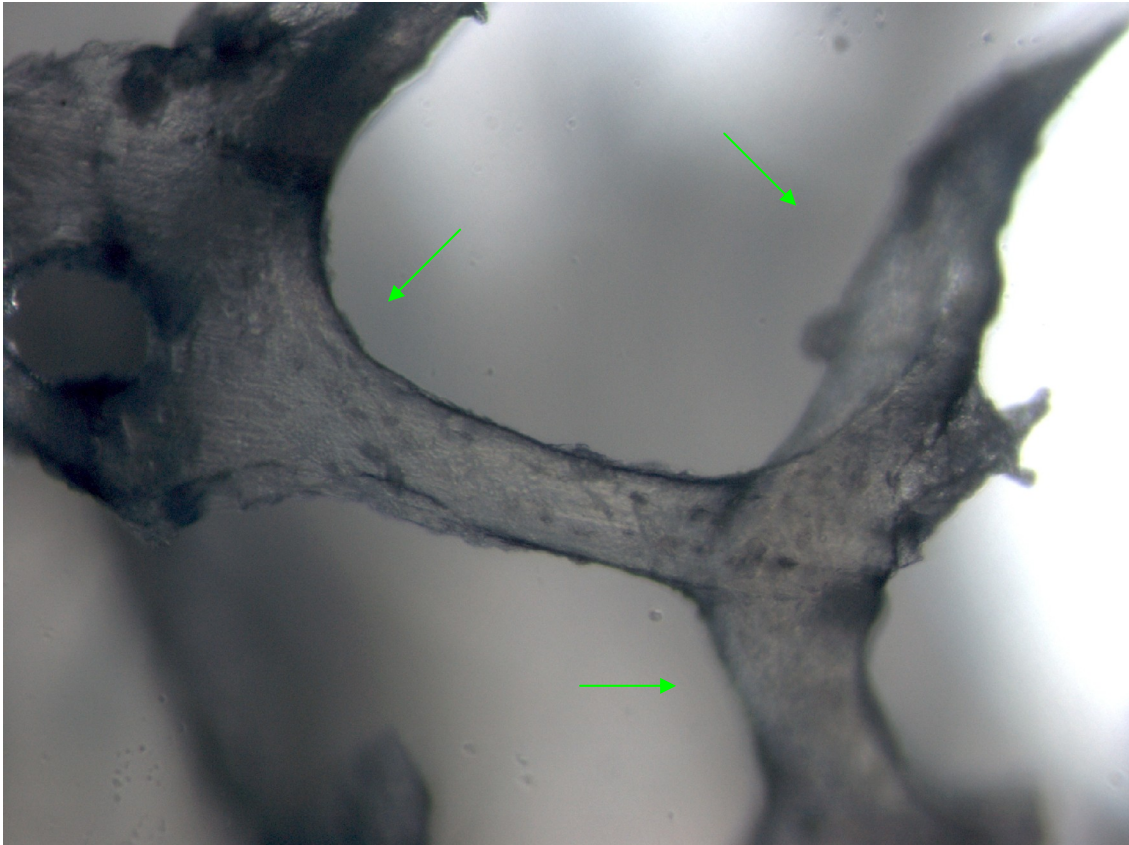


Abbildung 4-28 Spongiosascheibe „ γ -bestrahlt 25kGy“, 28 Tage nach Aussaat, auflichtmikroskopisch Vergrößerung 100x, Direktfärbung Trypanblau

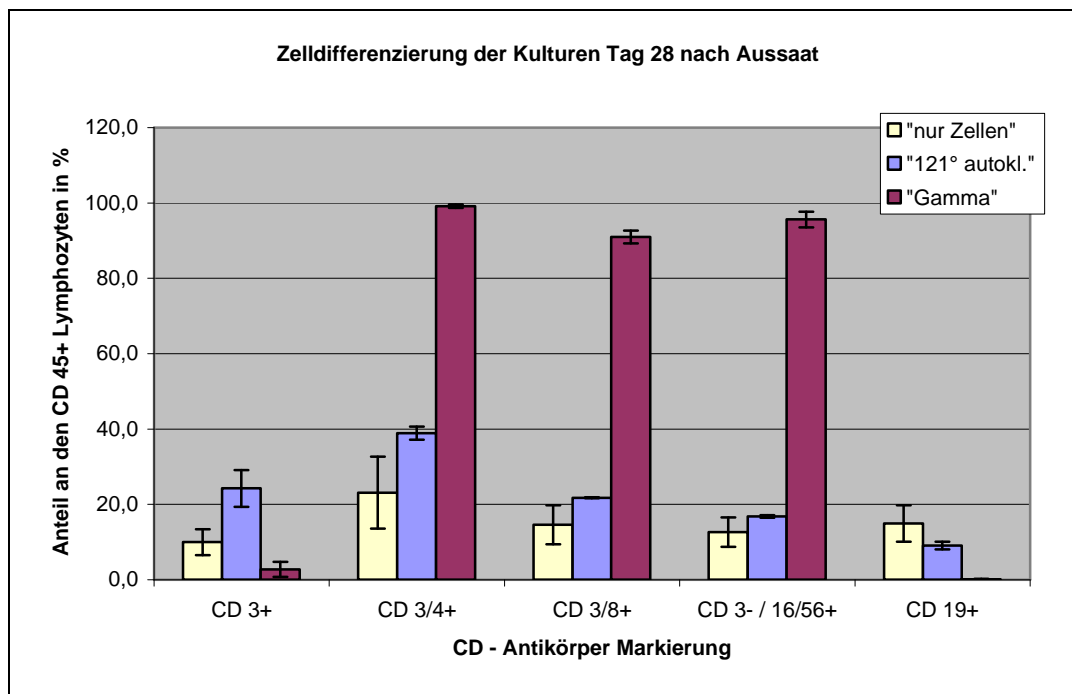
Es zeigen sich nach Zelllösung durch Accutase® zellose Knochentrabekel der 25kGy γ -bestrahlten Knochenproben (grüne Pfeile). Es finden sich keine Hinweise für interkonektierende Netzwerke oder verbliebene Zellansammlungen.

Wie oben (4.2.5.) beschrieben, wurden einige der Kulturen am 28 Tag nach Aussaat abgebrochen und zur Vitalitätsbestimmung einer Trypanblaufärbung unterzogen. Die Zellen wurden dafür durch Accutase® aus den Kulturschalen gelöst. Die in Kulturschalen verbliebenen behandelten Knochenproben wurden ebenfalls mit Trypanblau gefärbt und auflichtmikroskopisch kontrolliert.

Es zeigten sich auf den behandelten Spongiosascheiben der Kulturen „autoklaviert 121°C“ adhärente, vitale Zellen, die sich im Verbund dem Knochen aufgelagert hatten und eine Matrix zwischen den Knochentrabekeln bildeten (Abb.4-26;4-27).

Die Trabekel der behandelten Spongiosascheiben „ γ -bestrahlt 25kGy“ zeigten keine Anzeichen für Matrixbildung, Netzwerke oder adhärente, vitale Zellen (Abb.4-28).

4.2.7 FACS – Analyse der verschiedenen Kulturen



Zelldifferenzierung Tag 28 nach Aussaat

		prozentualer Anteil der CD - markierten Subpopulation in % an den CD 45+ Lymphozyten				
		CD 3+	CD 3+ / 4+	CD 3+ / 8+	CD 3- / 16+ / 56+	CD 19+
Kontrollkultur	Mittelwert	10,00	23,12	14,61	12,64	14,92
	Standardabw.	3,45	9,56	5,16	3,87	4,84
Kultur 121°C autoklaviert	Mittelwert	24,26	38,89	21,75	16,80	9,08
	Standardabw.	4,87	1,73	0,14	0,30	1,06
Kultur 25kGy γ-bestrahlt	Mittelwert	2,74	99,14	91,01	95,61	0,11
	Standardabw.	1,99	0,46	1,69	2,09	0,13

T - Test					
	CD 3+	CD 3+ / 4+	CD 3+ / 8+	CD 3- / 16+ / 56+	CD 19+
Zellen / 121° autokl.	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Zellen / 25kGy	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
25kGy / 121° autokl.	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Abbildung 4-29 Darstellung der FACS-Analysender Kulturen an Tag 28 nach Aussaat

Tabelle und Graphik stellen den prozentualen Anteil der Subpopulation (x-Achse zeigt die Kombination der jeweiligen CD-Antikörper) an der Gesamtpopulation der CD 45⁺ Lymphozyten (y-Achse) dar.

Mittelwerte x=5.

CD3 ⁺	:	reife T-Zelle
CD3/4 ⁺	:	T-Helfer-Zelle
CD3/8 ⁺	:	Suppressor-/ Zytotoxische T-Zellen
CD3 ⁻ /16 ⁺ /56 ⁺	:	NKZ, natürliche-Killer-Zellen
CD19 ⁺	:	B-Zelle

Die obige Grafik und Tabelle zeigen die Zellzusammensetzungen der verschiedenen Kulturen an Tag 28 nach Aussaat anhand der Zelloberflächenantigene. Die Mittelwerte errechnen sich aus $x=5$. Abgebildet sind der prozentuale Anteil der phänotypisch bestimmten Subpopulationen aller CD45⁺-Zellen (Lymphozyten).

Zur Auswertung wurden jeweils 10.000 Events innerhalb der CD45⁺-Zellpopulation gewertet (Abb.4-29)

Bei der 25kGy-Radiatio kam es zu einer deutlichen Verschiebung der Subpopulationen. Es zeigte sich eine exzessive Vermehrung von Suppressor- bzw. Zytotoxischer T-Zellen (CD3/8⁺), T-Helfer-Zellen (CD3/4⁺) und natürlicher-Killer-Zellen (CD3⁻/16⁺/56⁺). und ein drastischer Rückgang an reifen T- (CD3⁺) und B-Zellen (CD19⁺).

Bei der 121°C Sterilisation konnte ebenfalls eine Verschiebung der Subpopulation mit einer Vermehrung reifer T-Zellen (CD3⁺), Suppressor- bzw. Zytotoxischer T-Zellen (CD3/8⁺) und T-Helfer-Zellen (CD3/4⁺) nachgewiesen werden. Der Anteil natürlicher-Killer-Zellen (CD3⁻/16⁺/56⁺) blieb unverändert, während der Anteil der B-Zellen (CD19⁺) zurückging.

Vergleicht man die Ergebnisse der Subpopulationen der verschiedenen Kulturen an Tag 28 nach Aussaat untereinander, errechneten sich für alle Konstellationen höchstsignifikante ($p<0,001$) Unterschiede. Ausnahme bildeten die Ergebnisse des Vergleichs Kontroll- gegen 121°C autoklavierte Kulturen. Der Unterschied für T-Helfer-Zellen (CD3/4⁺) und Suppressor- bzw. Zytotoxischer T-Zellen (CD3/8⁺) errechnete sich signifikant ($p<0,05$), für B-Zellen (CD19⁺) und natürliche-Killer-Zellen (CD3⁻/16⁺/56⁺) nicht signifikant ($p>0,05$).

4.2.8 Zytokinprofil der Zellkulturen unter Exposition mit behandelten Knochenprobenkörper

4.2.8.1 Zytokinprofil für Interleukin-6

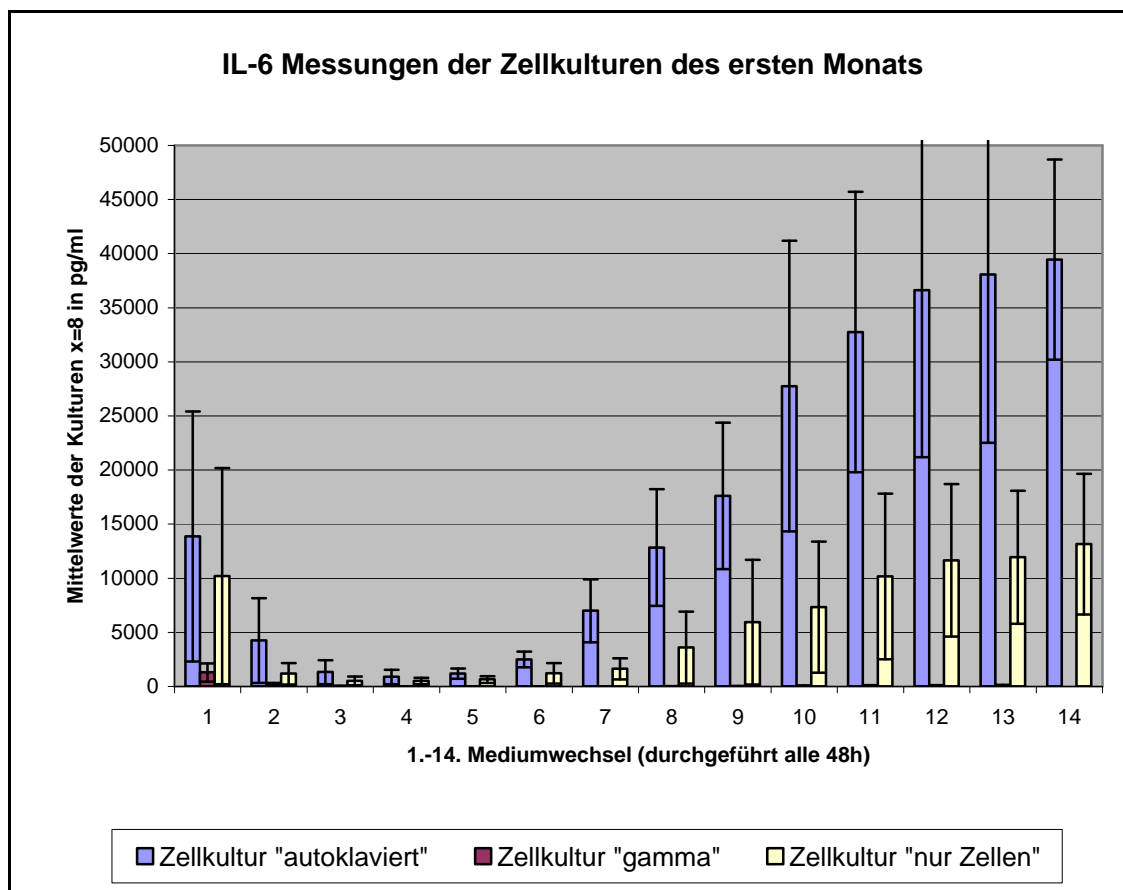


Abbildung 4-30 IL-6 Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen

Die Graphik stellt IL-6 Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen (Mittelwerte aus $x=8$ in pg/ml und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer (Angabe der durchgeführten Mediumwechsel alle 48h) dar..

Mittelwerte und Standardabweichung				IL-6			
	1	2	3	4	5	6	7
Autoklaviert	13852,648	4243,621	1316,820	873,663	1193,410	2492,741	6989,089
Stabw-Autoklaviert	11554,525	3912,048	1111,397	669,493	472,940	721,651	2902,468
Gamma	1287,761	166,383	23,010	6,346	4,283	3,941	6,140
Stabw-Gamma	852,785	152,514	26,490	8,280	5,502	4,341	7,134
Zellen	10199,476	1167,814	506,084	501,651	639,082	1201,468	1624,703
Stabw-Zellen	9982,804	996,379	400,344	286,033	317,549	945,278	982,645

	8	9	10	11	12	13	14
Autoklaviert	12833,232	17617,422	27756,487	32755,303	36625,788	38075,836	39445,159
Stabw-Autoklaviert	5393,183	6772,777	13424,664	12946,308	15438,948	15567,377	9250,834
Gamma	9,455	17,573	45,008	47,696	49,311	72,931	
Stabw-Gamma	12,821	26,691	52,298	56,316	60,347	79,327	
Zellen	3603,481	5946,249	7340,651	10167,183	11654,175	11945,066	13142,120
Stabw-Zellen	3323,807	5764,535	6059,633	7660,474	7050,085	6150,166	6505,146

T-Test				IL-6			
	1	2	3	4	5	6	7
Auto/Zellen	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,01
Auto/Gamma	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Gamma/Zellen	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001

	8	9	10	11	12	13	14
Auto/Zellen	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,001
Auto/Gamma	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	
Gamma/Zellen	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,01	

Abbildung 4-31 Tabelle IL-6 Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen

Die Tabelle stellt die Mittelwerte ($x=8$ und entsprechender Standardabweichung) der IL-6 Freisetzung (pg/ml) der humanen Knochenmarkszellkulturen dar. Im unteren Tabellenteil die berechnete Signifikanz, bestimmt durch den t-Test nach Student für unverbundene Stichproben. Hier ist die Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) direkt angegeben.

4.2.8.2 Zytokinprofil für Interleukin – 6 ab Tag 36 nach Aussaat

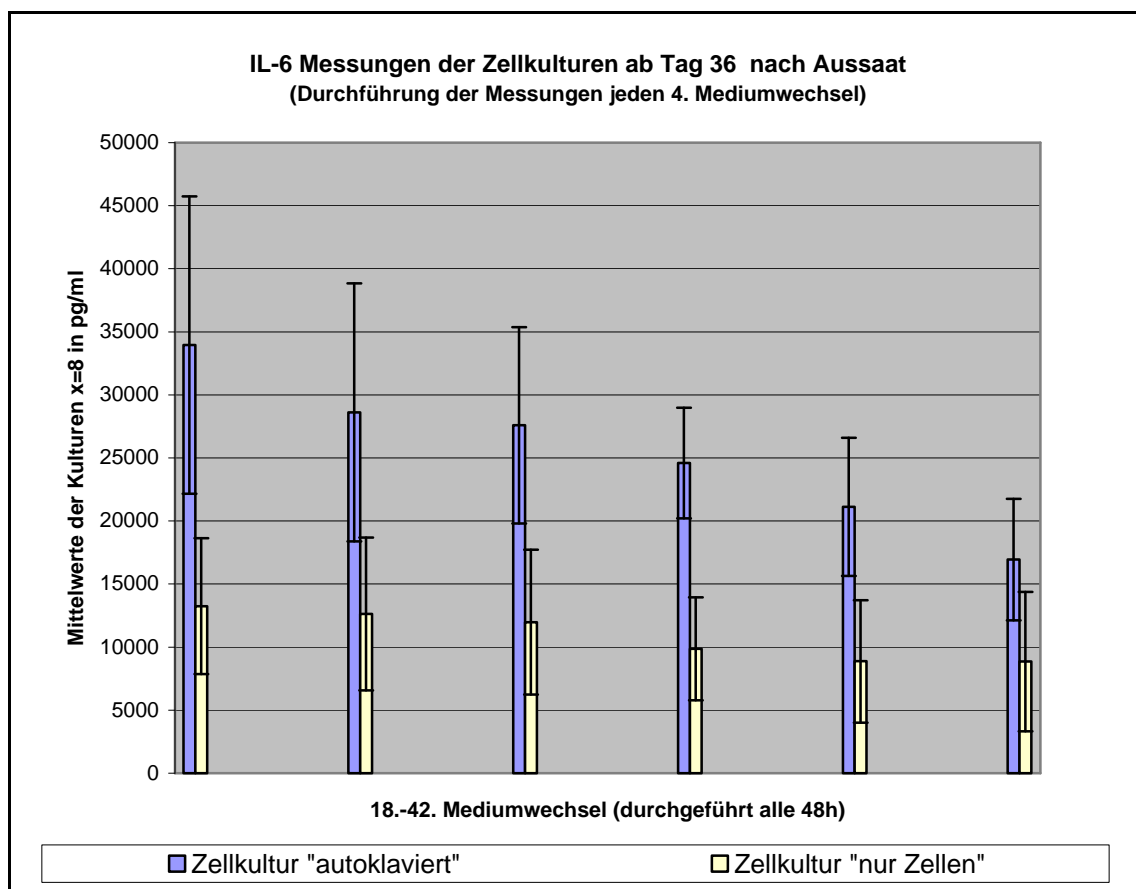


Abbildung 4-32 IL-6 Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen ab 18. Mediumwechsel

Die Graphik stellt IL-6 Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen (Mittelwerte aus $x=8$ in pg/ml und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer dar.

Das Medium wurde weiterhin alle 48h gewechselt. An jedem vierten Mediumwechsel wurden Bestimmungen durchgeführt. Für die Kulturen 25kGy γ -bestrahlt waren die Werte nicht messbar, eine Darstellung unterbleibt.

Mittelwerte und Standardabweichung

IL-6

18	22	26	30	34	38	42
----	----	----	----	----	----	----

Autoklaviert	33939,688	28611,795	27581,456	24588,229	21110,454	16944,113	
Stabw-Autoklaviert	11791,331	10221,931	7783,500	4390,094	5478,775	4815,579	

Zellen	13244,363	12634,963	11976,148	9861,054	8863,125	8847,083	6362,753
Stabw-Zellen	5392,578	6056,846	5740,020	4087,165	4858,347	5518,086	3826,034

T-Test

IL-6

18	22	26	30	34	38	42
----	----	----	----	----	----	----

Auto/Zellen	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05	
-------------	-----------	----------	-----------	-----------	-----------	----------	--

Abbildung 4-33 Tabelle IL-6 Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen ab 18. Mediumwechsel
Die Tabelle stellt die Mittelwerte ($x=8$ und entsprechender Standardabweichung) der IL-6 Freisetzung (pg/ml) der humanen Knochenmarkszellkulturen dar. Im unteren Tabellenteil die berechnete Signifikanz, bestimmt durch den t-Test nach Student für unverbundene Stichproben. Hier ist die Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) direkt angegeben.

Im Untersuchungszeitraum zeigten die Kulturen „autoklaviert 121°C“ am 1. und 2. Mediumwechsel (entspricht Tag 2 und 4 nach Aussaat) für IL-6 hohe Werte mit einem darauf folgendem Abfall. Ein erneuter stetiger Anstieg konnte, den Kontrollkulturen ähnlich, ab dem 5. Mediumwechsel (entspricht Tag 10 nach Aussaat) beobachtet werden. Das Maximum wurde am 14. Mediumwechsel (entspricht Tag 28 nach Aussaat) erreicht und fiel danach wieder ab, jedoch lagen die Werte weiter größer 20000pg/ml.

Die Kulturen „ γ -bestrahlt 25kGy“ zeigten über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant niedrige Ergebnisse, im späteren Verlauf immer unterhalb der Nachweisgrenze, so dass auf die Darstellung in Tabelle und Graphik ab dem 18. Mediumwechsel (entspricht Tag 36 nach Aussaat) verzichtet wurde.

Nach Berechnung des t-Test nach Student konnten signifikante Unterschiede im Vergleich der unterschiedlichen Kulturen für das Zytokin IL-6 berechnet werden.

Im Vergleich der Kulturen „autoklaviert 121°C“ zu den Kontrollkulturen wurden signifikante ($p < 0.05$) Unterschiede am 5., 6. und 38. Mediumwechsel errechnet. Hochsignifikante ($p < 0.01$) Unterschiede an den Mediumwechseln 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 22, weiterhin höchstsignifikante ($p < 0.001$) Unterschiede an den Mediumwechseln 14, 18, 30, 34. Die IL-6 Werte der Kulturen „autoklaviert 121°C“ wurden im Kulturverlauf immer höher als die Kontrollkulturen gemessen.

Im Vergleich der Kulturen „autoklaviert 121°C“ zu „ γ -bestrahlt 25kGy“ wurden signifikante ($p < 0.05$) Unterschiede an den Mediumwechseln 1 und 2 errechnet. Hochsignifikante ($p < 0.01$) Unterschiede an den Mediumwechseln 3 und 4, sowie höchstsignifikante ($p < 0.001$) Unterschiede an den Mediumwechseln 5 bis 13.

Die IL-6 Werte der Kulturen „autoklaviert 121°C“ wurden im Kulturverlauf immer höher als die „ γ -bestrahlt 25kGy“ Kulturen gemessen.

Im Vergleich der Kulturen „ γ -bestrahlt 25kGy“ zu den Kontrollkulturen wurden signifikante ($p < 0.05$) Unterschiede am 1., 2. und 9., sowie hochsignifikante ($p < 0.01$) Unterschiede an den Mediumwechseln 3, 6, 8, 10 und 13 errechnet. Höchstsignifikante ($p < 0.001$) Unterschiede ergaben sich an den Mediumwechseln 4, 5, 7, 11 und 12. Die IL-6 Werte der Kontrollkulturen wurden im Kulturverlauf immer höher als die „ γ -bestrahlt 25kGy“ Kulturen gemessen (Abb.4-30;4-31;4-32;4-33).

4.2.8.3 Zytokinprofil für Interleukin – 1 β

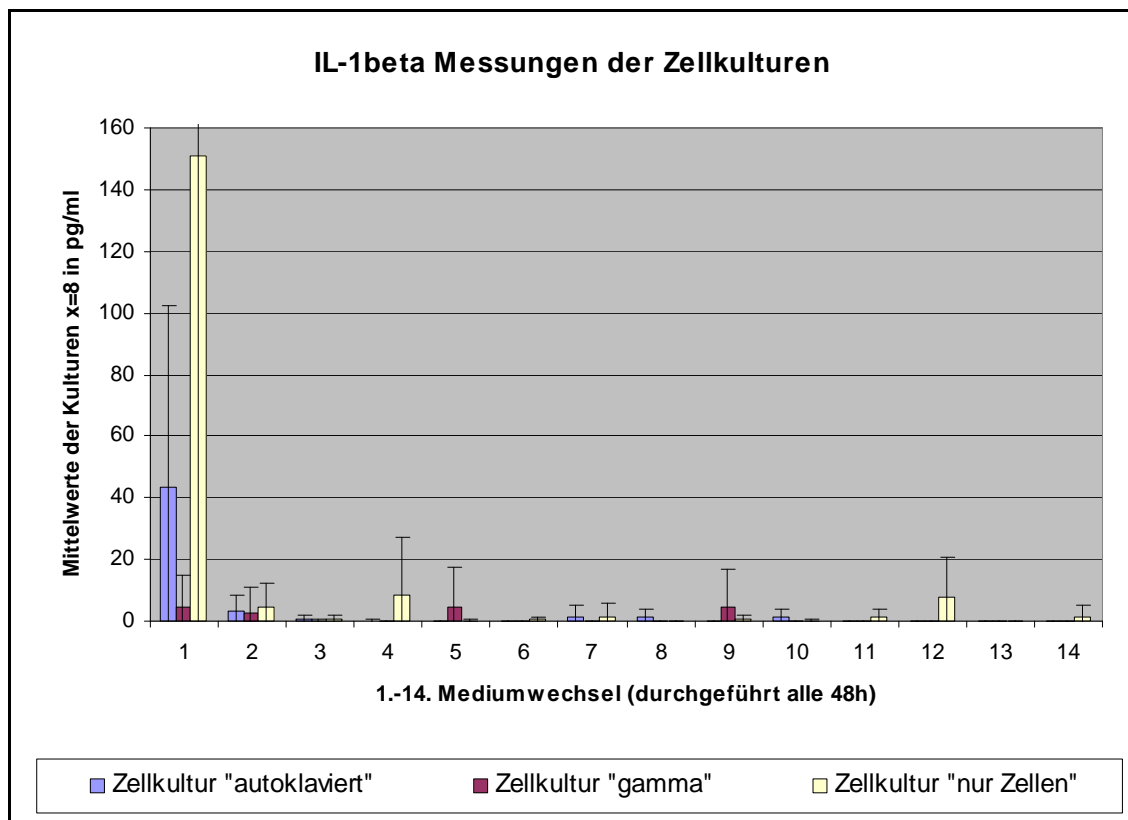


Abbildung 4-34 IL- 1 β Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen

Die Graphik stellt IL-6 Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen (Mittelwerte aus $x=8$ in pg/ml und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer (Angabe der durchgeführten Mediumwechsel alle 48h) dar.

Mittelwerte und Standardabweichung				IL-1 β			
	1	2	3	4	5	6	7
Autoklaviert	43,573	2,968	0,563	0,229	0,000	0,000	1,302
Stabw-Autoklaviert	58,863	5,551	1,593	0,646	0,000	0,000	3,682
Gamma	4,302	2,902	0,174	0,000	4,630	0,000	0,000
Stabw-Gamma	10,400	8,207	0,491	0,000	13,096	0,000	0,000
Zellen	151,176	4,653	0,513	8,390	0,091	0,348	1,526
Stabw-Zellen	161,977	7,949	1,358	18,698	0,242	0,921	4,038

	8	9	10	11	12	13	14
Autoklaviert	1,094	0,000	0,979	0,000	0,000	0,000	0,000
Stabw-Autoklaviert	3,095	0,000	2,768	0,000	0,000	0,000	0,000
Gamma	0,000	4,414	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Stabw-Gamma	0,000	12,484	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Zellen	0,000	0,491	0,091	1,020	7,867	0,000	1,537
Stabw-Zellen	0,000	1,300	0,240	2,699	12,603	0,000	3,771

T-Test				IL-1 β			
	1	2	3	4	5	6	7
Auto/Zellen	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Auto/Gamma	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05		p > 0,05
Gamma/Zellen	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

	8	9	10	11	12	13	14
Auto/Zellen	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05		p > 0,05
Auto/Gamma	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05				
Gamma/Zellen		p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05		p > 0,05

Abbildung 4-35 Tabelle IL- 1 β Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen

Die Tabelle stellt die Mittelwerte ($x=8$ und entsprechender Standardabweichung) der IL- 1 β Freisetzung (pg/ml) der humanen Knochenmarkszellkulturen dar. Im unteren Tabellenteil die berechnete Signifikanz, bestimmt durch den t-Test nach Student für unverbundene Stichproben. Hier ist die Fehlerwahrscheinlichkeiten (p-Wert) direkt angegeben.

Nur beim ersten Mediumwechsel konnten die Kulturen „autoklaviert 121°C“ und die Kontrollkultur bei der Analyse des Zytokinprofils IL - 1 β die Nachweisgrenze von 5pg/ml überschreiten, danach lagen sie für den Untersuchungszeitraum unterhalb dieser Grenze, so dass auf die Darstellung ab dem 18. Mediumwechsel (entspricht Tag 36 nach Aussaat) verzichtet wurde. Über den ganzen Untersuchungszeitraum waren im Vergleiche der unterschiedlichen Kulturen keine signifikanten Unterschiede bei der Berechnung des t-Tests nachweisbar (Abb.4-34;4-35).

4.2.8.4 Zytokinprofil für Interferon – γ

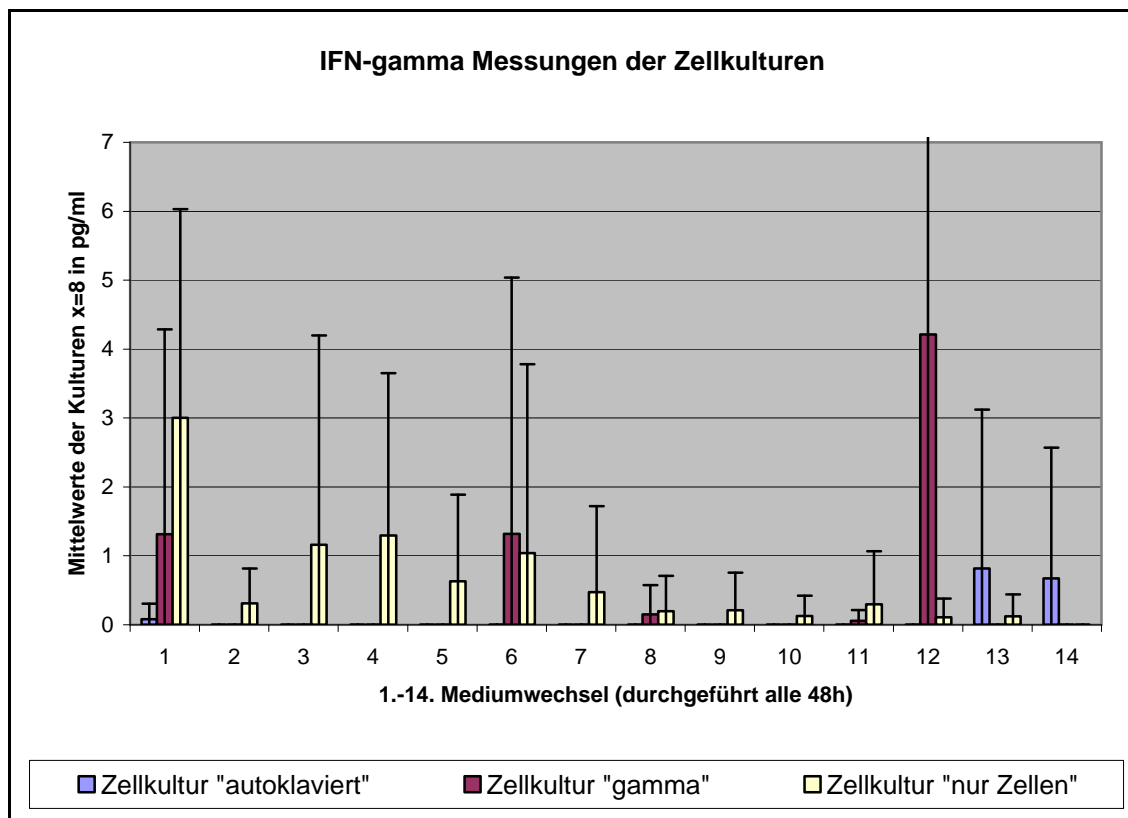


Abbildung 4-36 IFN- γ Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen

Die Graphik stellt IFN- γ Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen (Mittelwerte aus $n=8$ in pg/ml und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer (Angabe der durchgeführten Mediumwechsel alle 48h) dar.

Mittelwerte und Standardabweichung		IFN- γ					
	1	2	3	4	5	6	7
Autoklaviert	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Stabw-Autoklaviert	0,225	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Gamma	1,315	0,000	0,000	0,000	0,000	1,316	0,000
Stabw-Gamma	2,974	0,000	0,000	0,000	0,000	3,723	0,000
Zellen	3,000	0,309	1,158	1,295	0,629	1,037	0,473
Stabw-Zellen	3,029	0,509	3,043	2,354	1,259	2,744	1,250

	8	9	10	11	12	13	14
Autoklaviert	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,816	0,671
Stabw-Autoklaviert	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	2,307	1,898
Gamma	0,150	0,000	0,000	0,056	4,214	0,000	0,000
Stabw-Gamma	0,424	0,000	0,000	0,157	10,536	0,000	0,000
Zellen	0,195	0,207	0,127	0,297	0,105	0,120	0,000
Stabw-Zellen	0,515	0,549	0,296	0,771	0,277	0,318	0,000

T-Test		IFN- γ					
	1	2	3	4	5	6	7
Auto/Zellen	p < 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Auto/Gamma	p > 0,05					p > 0,05	
Gamma/Zellen	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

	8	9	10	11	12	13	14
Auto/Zellen	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Auto/Gamma	p > 0,05			p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Gamma/Zellen	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

Abbildung 4-37 Tabelle IFN- γ Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen

Die Tabelle stellt die Mittelwerte ($x=8$ und entsprechender Standardabweichung) der IFN- γ Freisetzung (pg/ml) der humanen Knochenmarkszellkulturen dar. Im unteren Tabellenteil die berechnete Signifikanz, bestimmt durch den t-Test nach Student für unverbundene Stichproben. Hier ist die Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) direkt angegeben.

Die Werte für IFN – γ lagen über den gesamten Untersuchungszeitraum bei allen Kulturen unter der Nachweisgrenze von 5pg/ml, so dass auf die Darstellung ab dem 18. Mediumwechsel (entspricht Tag 36 nach Aussaat) verzichtet wurde.

Über den ganzen Untersuchungszeitraum waren im Vergleich der unterschiedlichen Kulturen keine signifikanten Unterschiede bei der Berechnung des t-Tests nachweisbar (Abb.4-36;4-37).

4.2.8.5 Zytokinprofil für TNF – α

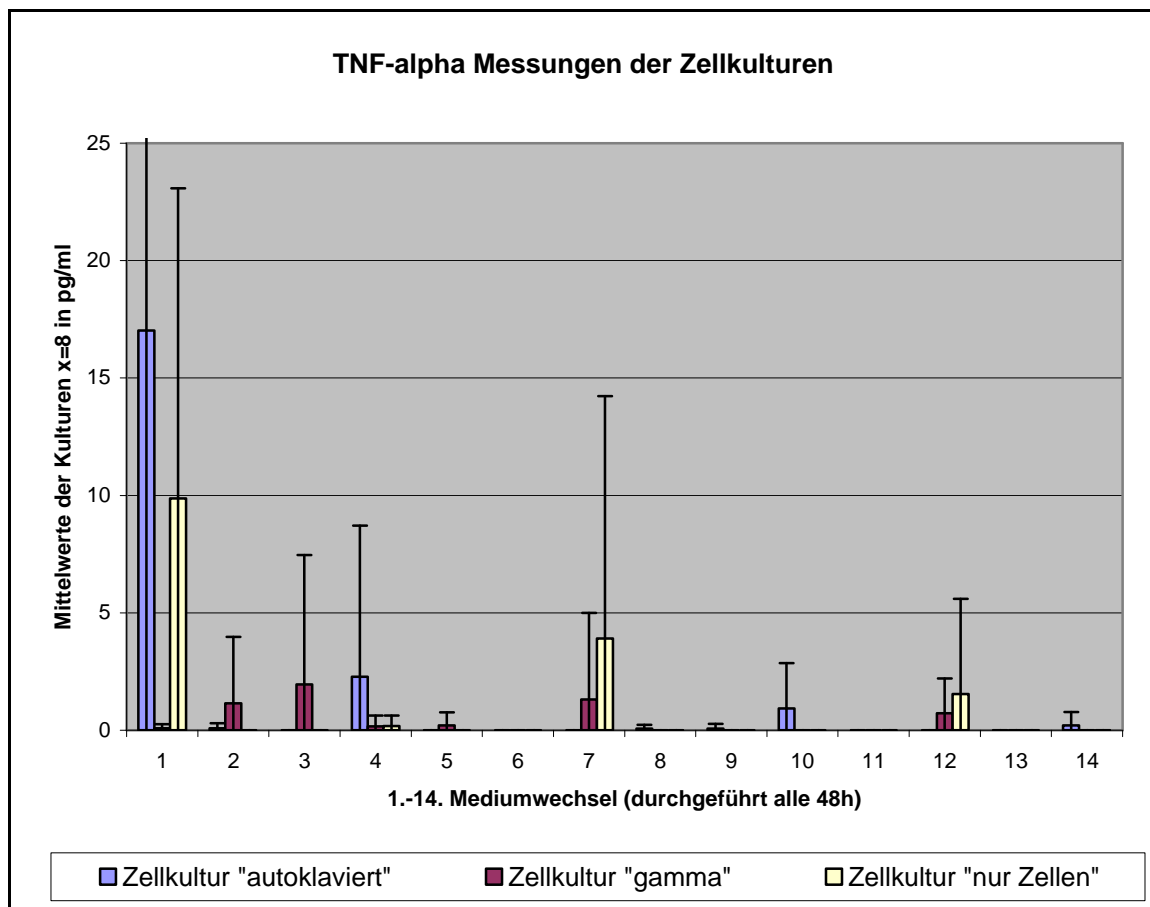


Abbildung 4-38 TNF – α Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen

Die Graphik stellt TNF – α Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen (Mittelwerte aus $x=8$ in pg/ml und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer (Angabe der durchgeführten Mediumwechsel alle 48h) dar.

Mittelwerte und Standardabweichung				TNF- α			
	1	2	3	4	5	6	7
Autoklaviert	17,020	0,077	0,000	2,276	0,000	0,000	0,000
Stabw-Autoklaviert	18,196	0,217	0,000	6,438	0,000	0,000	0,000
Gamma	0,086	1,145	1,949	0,164	0,201	0,000	1,304
Stabw-Gamma	0,172	2,835	5,512	0,463	0,568	0,000	3,689
Zellen	9,868	0,000	0,000	0,171	0,000	0,000	3,901
Stabw-Zellen	13,212	0,000	0,000	0,452	0,000	0,000	10,322

	8	9	10	11	12	13	14
Autoklaviert	0,062	0,070	0,927	0,000	0,000	0,000	0,204
Stabw-Autoklaviert	0,175	0,197	1,932	0,000	0,000	0,000	0,577
Gamma	0,000	0,000	0,000	0,000	0,717	0,000	0,000
Stabw-Gamma	0,000	0,000	0,000	0,000	1,490	0,000	0,000
Zellen	0,000	0,000	0,000	0,000	1,535	0,000	0,000
Stabw-Zellen	0,000	0,000	0,000	0,000	4,061	0,000	0,000

T-Test		TNF- α					
	1	2	3	4	5	6	7
Auto/Zellen	p > 0,05	p > 0,05		p > 0,05			p > 0,05
Auto/Gamma	p < 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05		p > 0,05
Gamma/Zellen	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05		p > 0,05

	8	9	10	11	12	13	14
Auto/Zellen	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05		p > 0,05		p > 0,05
Auto/Gamma	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05		p > 0,05		p > 0,05
Gamma/Zellen					p > 0,05		

Abbildung 4-39 Tabelle TNF – α Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen

Die Tabelle stellt die Mittelwerte ($x=8$ und entsprechender Standardabweichung) der TNF – α Freisetzung (pg/ml) der humanen Knochenmarkszellkulturen dar. Im unteren Tabellenteil die berechnete Signifikanz, bestimmt durch den t-Test nach Student für unverbundene Stichproben. Hier ist die Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) direkt angegeben.

Nur beim 1. Mediumwechsel konnten die Kulturen „autoklaviert 121°C“ und die Kontrollkulturen bei der Analyse des Zytokinprofils TNF – α die Nachweisgrenze von 5pg/ml überschreiten, danach lagen sie für den Untersuchungszeitraum unterhalb dieser Grenze. Auf die Darstellung ab dem 18. Mediumwechsel (entspricht Tag 36 nach Aussaat) wurde verzichtet. Über den ganzen Untersuchungszeitraum waren im Vergleich der unterschiedlichen Kulturen keine signifikanten Unterschiede bei der Berechnung des t-Tests nachweisbar (Abb.4-38;4-39).

4.2.9 Lactatwerte und Enzymprofil der Zellkulturen unter Exposition mit behandelten Knochenprobenkörper

4.2.9.1 Profil der Lactatwerte

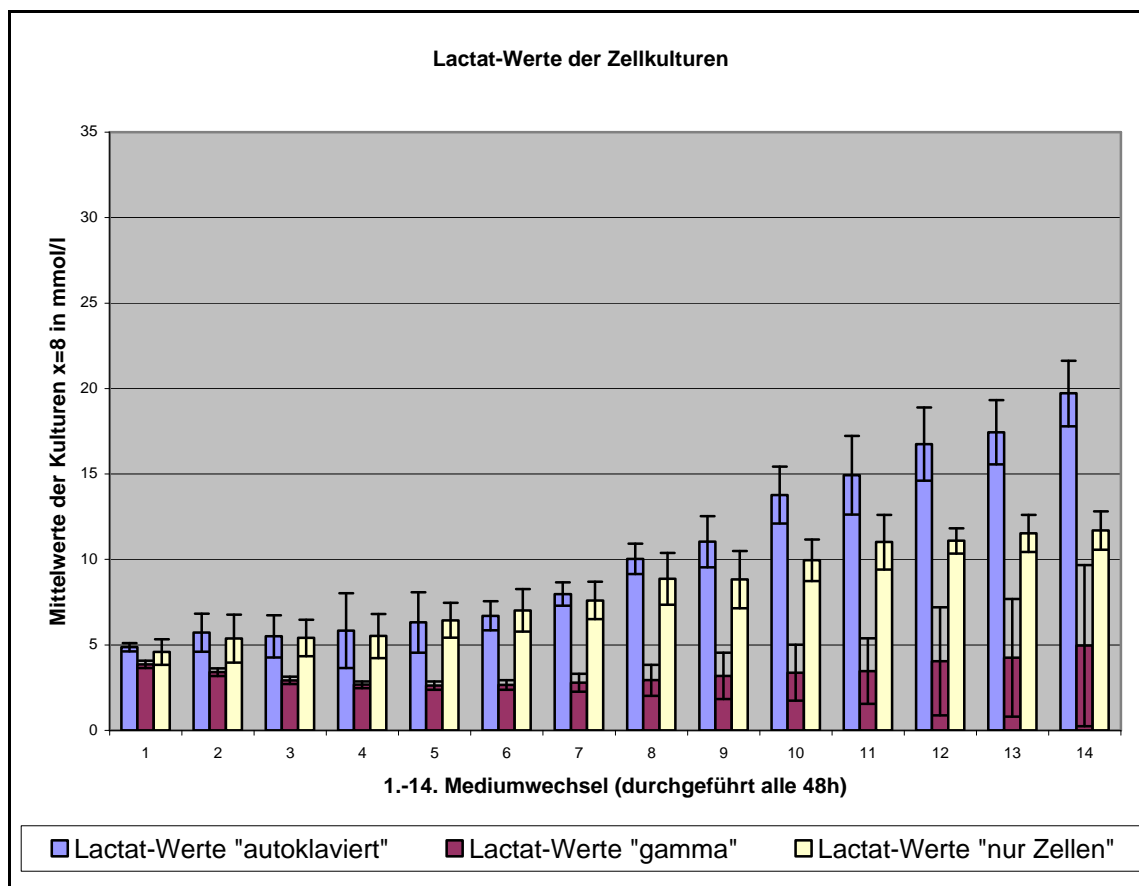


Abbildung 4-40 Lactat Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen

Die Graphik stellt Lactat Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen (Mittelwerte aus $x=8$ in mmol/l und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer (Angabe der durchgeführten Mediumwechsel alle 48h) dar.

Mittelwerte und Standardabweichung				Lactat			
	1	2	3	4	5	6	7
Autoklaviert	4,864	5,718	5,499	5,844	6,314	6,701	7,975
Stabw-Autoklaviert	0,251	1,106	1,239	2,188	1,773	0,848	0,684
Gamma	3,858	3,409	2,928	2,666	2,621	2,654	2,786
Stabw-Gamma	0,213	0,221	0,213	0,196	0,239	0,280	0,527
Zellen	4,590	5,364	5,401	5,517	6,444	7,017	7,603
Stabw-Zellen	0,749	1,403	1,067	1,284	1,017	1,245	1,102

	8	9	10	11	12	13	14
Autoklaviert	10,034	11,033	13,766	14,923	16,749	17,439	19,714
Stabw-Autoklaviert	0,884	1,499	1,663	2,300	2,142	1,881	1,918
Gamma	2,930	3,186	3,370	3,470	4,039	4,249	4,959
Stabw-Gamma	0,905	1,358	1,638	1,925	3,166	3,441	4,720
Zellen	8,867	8,823	9,951	11,011	11,089	11,524	11,693
Stabw-Zellen	1,516	1,679	1,220	1,602	0,737	1,081	1,128

T-Test				Lactat			
	1	2	3	4	5	6	7
Auto/Zellen	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Auto/Gamma	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Gamma/Zellen	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

	8	9	10	11	12	13	14
Auto/Zellen	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Auto/Gamma	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Gamma/Zellen	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01

Abbildung 4-41 Tabelle Lactat Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen

Die Tabelle stellt die Mittelwerte ($\bar{x}=8$ und entsprechender Standardabweichung) der Lactat Werte (mmol/l) der humanen Knochenmarkszellkulturen dar. Im unteren Tabellenteil die berechnete Signifikanz, bestimmt durch den t-Test nach Student für unverbundene Stichproben. Hier ist die Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) direkt angegeben.

4.2.9.2 Profil der Lactatwerte ab Tag 36 nach Aussaat

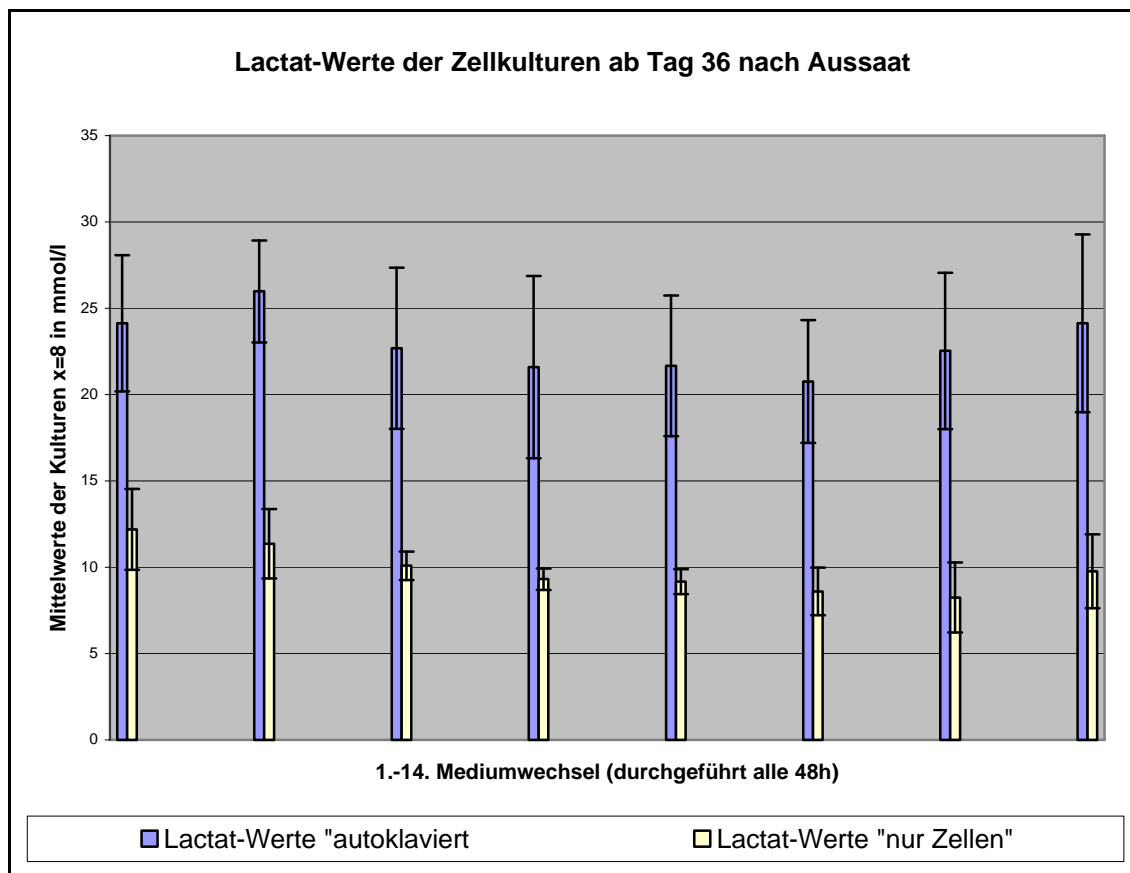


Abbildung 4-42 Lactat Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen ab 18. Mediumwechsel

Die Graphik stellt die Lactat Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen (Mittelwerte aus $x=8$ in mmol/l und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer dar.

Das Medium wurde weiterhin alle 48h gewechselt. An jedem vierten Mediumwechsel wurden Bestimmungen durchgeführt. Für die Kulturen 25kGy γ -bestrahlt waren die Werte nicht messbar, eine Darstellung unterbleibt.

Mittelwerte und Standardabweichung

Lactat

18	22	26	30	34	38	42
----	----	----	----	----	----	----

Autoklaviert	24,131	25,975	22,686	21,594	21,669	20,756	22,531
Stabw-Autoklaviert	3,938	2,958	4,662	5,273	4,073	3,561	4,522

Zellen	12	11	10	9	9	9	8
Stabw-Zellen	2,340	2,014	0,822	0,620	0,720	1,384	2,026

T-Test

Lactat

18	22	26	30	34	38	42
----	----	----	----	----	----	----

Auto/Zellen	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
-------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

Abbildung 4-43 Tabelle Lactat Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen ab 18. Mediumwechsel

Die Tabelle stellt die Mittelwerte ($\bar{x}=8$ und entsprechender Standardabweichung) der Lactat Werte (mmol/l) der humanen Knochenmarkszellkulturen dar. Im unteren Tabellenteil die berechnete Signifikanz, bestimmt durch den t-Test nach Student für unverbundene Stichproben. Hier ist die Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) direkt angegeben.

Nach anfänglich niedrigen Konzentrationen an Lactat, kam es, ähnlich der Kontrollkultur, ab dem 5. Mediumwechsel (entspricht Tag 10 nach Aussaat) zu einem stetigen Ansteigen der Konzentration bei den Kulturen „autoklaviert 121°C“. Das Maximum wurde am 22. Mediumwechsel (entspricht Tag 44 nach Aussaat) mit ca. 26mmol/l bestimmt. Über den weiteren Verlauf hielt sich das Lactat bei Werten um die 21mmol/l in den Kulturen „autoklaviert 121°C“.

Die Kulturen „ γ -bestrahlt 25kGy“ lagen bei der Lactatkonzentration im Untersuchungszeitraum immer unterhalb von 5mmol/l, darum wurde auf die Darstellung ab dem 18. Mediumwechsel (entspricht Tag 36 nach Aussaat) verzichtet.

Im Vergleich der Kulturen „autoklaviert 121°C“ zu den Kontrollkulturen wurden signifikante ($p<0,05$) Unterschiede am 9. Mediumwechsel (entspricht Tag 18 nach

Aussaat) errechnet. Hochsignifikante ($p < 0,01$) Unterschiede am 11. Mediumwechsel, sowie höchstsignifikante ($p < 0,001$) Unterschiede an den Mediumwechseln 10,12,13,14,18 bis 42.

Im Vergleich der Kulturen „autoklaviert 121°C“ zu „ γ -bestrahlt 25kGy“ wurden hochsignifikante Unterschiede am 4. Mediumwechsel errechnet ($p < 0,01$), höchstsignifikante ($p < 0,001$) Unterschiede an den Mediumwechseln 2 und 3, sowie 5 bis 14.

Im Vergleich der Kulturen „ γ -bestrahlt 25kGy“ zu den Kontrollkulturen wurden signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede am 1. Mediumwechsel, sowie hochsignifikante ($p < 0,01$) Unterschiede am 2. und 14. Mediumwechsel errechnet.

Höchstsignifikante ($p < 0,001$) Unterschiede ergaben sich an den Mediumwechseln 3 bis 13 (Abb.4-40;4-41;4-42;4-43).

4.2.9.3 Enzymprofil der Lactatdehydrogenase

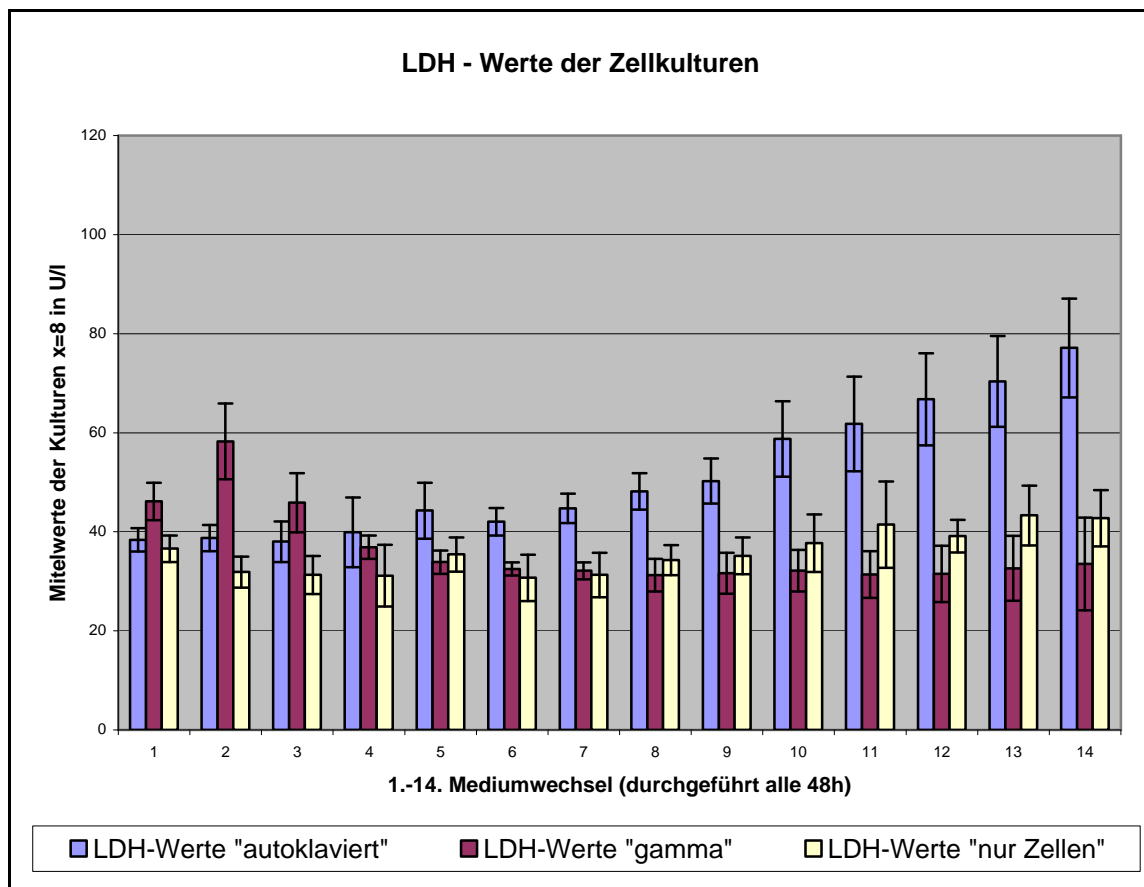


Abbildung 4-44 LDH Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen

Die Graphik stellt die Werte der Lactatdehydrogenase der humanen Knochenmarkszellkulturen (Mittelwerte aus $\bar{x}=8$ in U/l und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer (Angabe der durchgeführten Mediumwechsel alle 48h) dar.

Mittelwerte und Standardabweichung				LDH			
	1	2	3	4	5	6	7
Autoklaviert	38,375	38,750	38,000	39,875	44,250	42,000	44,750
Stabw-Autoklaviert	2,387	2,659	4,106	7,039	5,676	2,777	2,964
Gamma	46,125	58,250	45,875	36,875	33,875	32,500	32,125
Stabw-Gamma	3,758	7,667	5,963	2,357	2,357	1,309	1,727
Zellen	36,571	31,857	31,286	31,143	35,429	30,714	31,286
Stabw-Zellen	2,699	3,132	3,861	6,256	3,457	4,680	4,499

	8	9	10	11	12	13	14
Autoklaviert	48,125	50,250	58,750	61,750	66,750	70,375	77,125
Stabw-Autoklaviert	3,682	4,528	7,611	9,558	9,316	9,180	9,963
Gamma	31,250	31,625	32,125	31,375	31,500	32,625	33,500
Stabw-Gamma	3,284	4,138	4,190	4,719	5,657	6,567	9,335
Zellen	34,286	35,143	37,714	41,429	39,143	43,286	42,714
Stabw-Zellen	3,039	3,716	5,823	8,696	3,288	6,020	5,678

T-Test				LDH			
	1	2	3	4	5	6	7
Auto/Zellen	p > 0,05	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001
Auto/Gamma	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01	p > 0,05	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Gamma/Zellen	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

	8	9	10	11	12	13	14
Auto/Zellen	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Auto/Gamma	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Gamma/Zellen	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,05

Abbildung 4-45 Tabelle LDH Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen

Die Tabelle stellt die Mittelwerte ($x=8$ und entsprechender Standardabweichung) der LDH Werte (U/l) der humanen Knochenmarkszellkulturen dar. Im unteren Tabellenteil die berechnete Signifikanz, bestimmt durch den t-Test nach Student für unverbundene Stichproben. Hier ist die Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) direkt angegeben.

4.2.9.4 Enzymprofil der Lactatdehydrogenase ab Tag 36 nach Aussaat

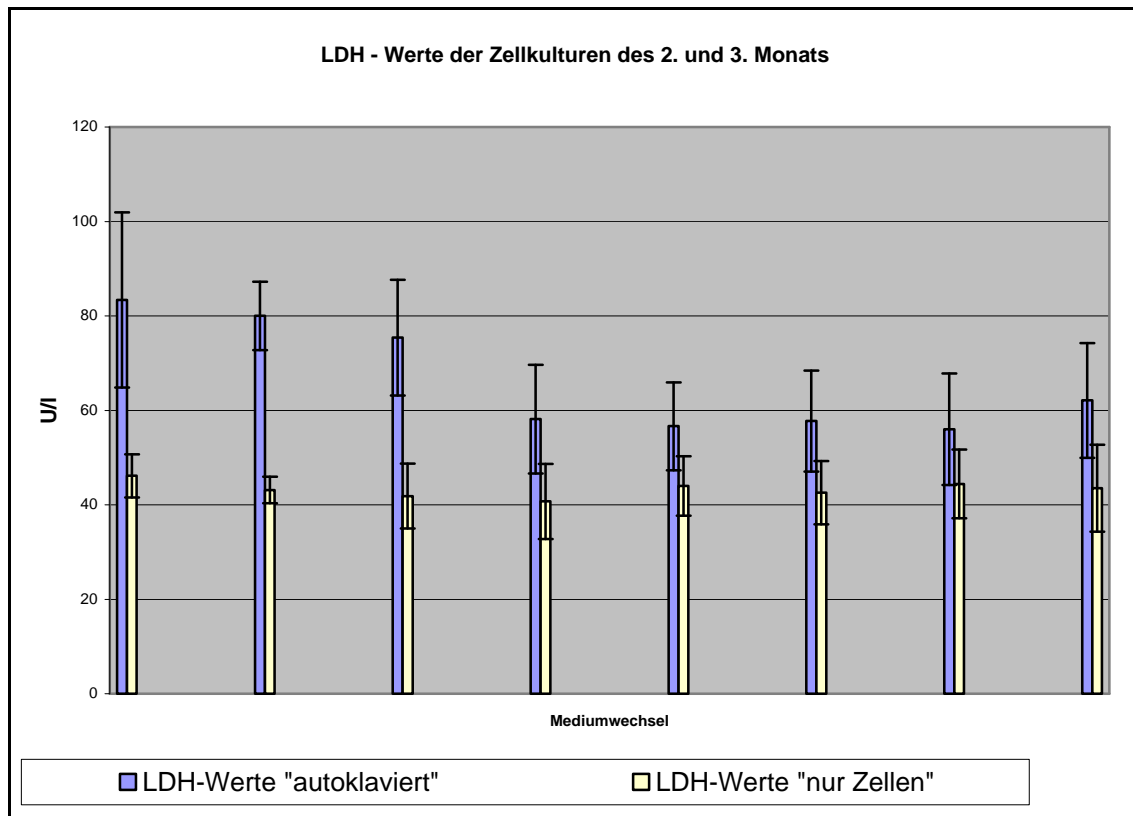


Abbildung 4-46 LDH Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen ab 18. Mediumwechsel

Die Graphik stellt die LDH Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen (Mittelwerte aus $x=8$ in U/l und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer dar.

Das Medium wurde weiterhin alle 48h gewechselt. An jedem vierten Mediumwechsel wurden Bestimmungen durchgeführt. Für die Kulturen 25kGy γ -bestrahlt waren die Werte nicht messbar, eine Darstellung unterbleibt.

Mittelwerte und Standardabweichung

LDH

	18	22	26	30	34	38	42
Autoklaviert	83,375	80,000	75,375	58,125	56,625	57,750	56,000
Stabw-Autoklaviert	18,547	7,270	12,258	11,519	9,319	10,700	11,832
Zellen	46	43	42	41	44	43	44
Stabw-Zellen	4,562	2,795	6,866	7,931	6,298	6,705	7,277

T-Test

LDH

	18	22	26	30	34	38	42
Auto/Zellen	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,05

Abbildung 4-47 Tabelle LDH Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen ab 18. Mediumwechsel
 Die Tabelle stellt die Mittelwerte ($x=8$ und entsprechender Standardabweichung) der LDH Werte (U/l) der humanen Knochenmarkszellkulturen dar. Im unteren Tabellenteil die berechnete Signifikanz, bestimmt durch den t-Test nach Student für unverbundene Stichproben. Hier ist die Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) direkt angegeben.

Die Kulturen „autoklaviert 121°C“ zeigten ab dem zweiten Mediumwechsel (entspricht Tag 4 nach Aussaat) einen stetigen Anstieg der LDH im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Ein Maximum erreichten sie am 18. Mediumwechsel (entspricht Tag 36 nach Aussaat) mit ca. 83U/l, danach fiel die Konzentration bei jedem weiteren Wechsel auf Werte um die 57U/l.

Die Kulturen „ γ – bestrahlt 25kGy“ erreichten ihr Maximum schon am zweiten Mediumwechsel (entspricht Tag 4 nach Aussaat) mit 58mmol/ml, danach sank die Konzentration im weiteren Verlauf auf Werte um 32mmol/ml.

Es errechneten sich folgende Signifikanzen im Vergleich der verschiedenen Kulturen:

Im Vergleich der Kulturen „autoklaviert 121°C“ zu den Kontrollkulturen wurden signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede an den Mediumwechseln 4, 30, 34, 38 errechnet. Hochsignifikante ($p < 0,01$) Unterschiede an den Mediumwechseln 3, 5 und 42, weiterhin höchstsignifikante ($p < 0,001$) Unterschiede an den Mediumwechseln 2, 6 bis 26.

Im Vergleich der Kulturen „autoklaviert 121°C“ zu „ γ -bestrahlt 25kGy“ wurden hochsignifikante ($p < 0,01$) Unterschiede am Mediumwechseln 3, sowie höchstsignifikante ($p < 0,001$) Unterschiede an den Mediumwechseln 1, 2, 5 bis 14 berechnet.

Im Vergleich der Kulturen „ γ -bestrahlt 25kGy“ zu den Kontrollkulturen wurden signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede am 4., 11. und 14. Mediumwechsel errechnet, sowie hochsignifikante ($p < 0,01$) Unterschiede an den Mediumwechseln 12 und 13. Höchstsignifikante ($p < 0,001$) Unterschiede ergaben sich an den Mediumwechseln 1, 2 und 3 (Abb.4-44;4-45;4-46;4-47).

4.2.9.5 Enzymprofil der Alkalischen Phosphatase

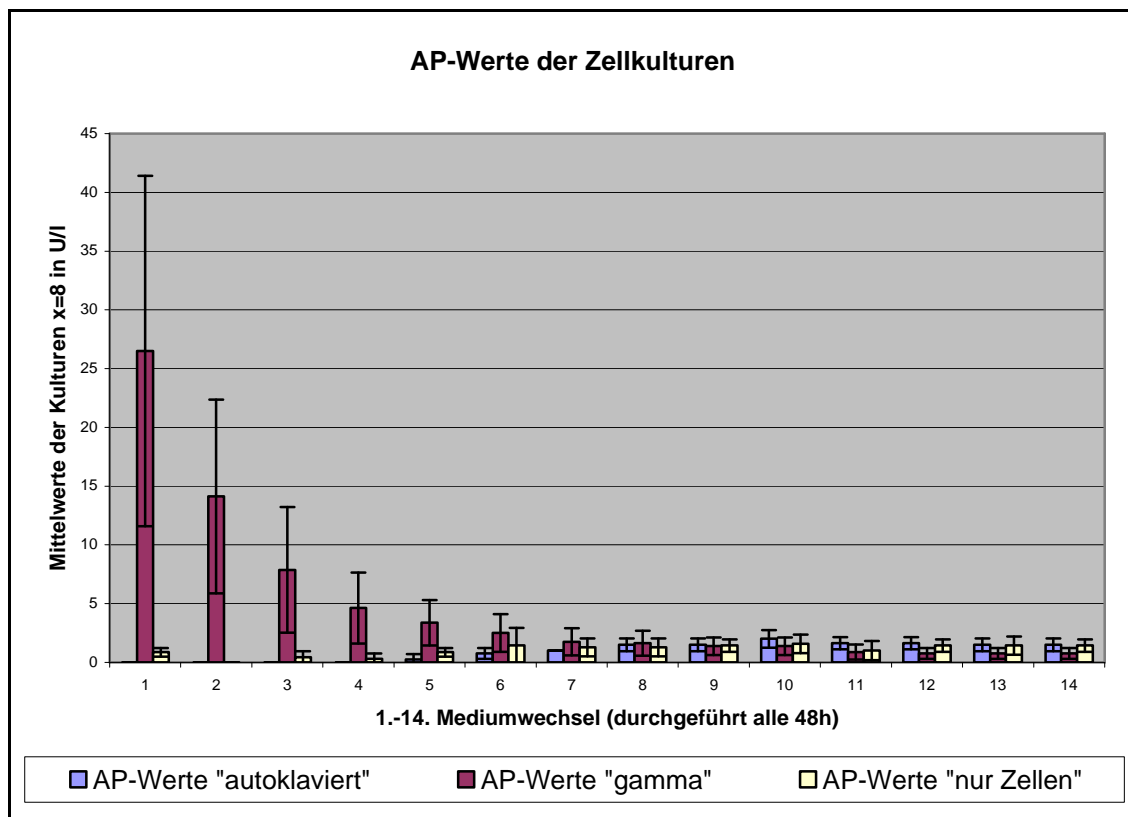


Abbildung 4-48 AP Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen

Die Graphik stellt Lactat Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen (Mittelwerte aus $x=8$ in U/l und entsprechender Standardabweichung) in Abhängigkeit der Kulturdauer (Angabe der durchgeführten Mediumwechsel alle 48h) dar.

Mittelwerte und Standardabweichung				AP			
	1	2	3	4	5	6	7
Autoklaviert	0,000	0,000	0,000	0,000	0,250	0,750	1,000
Stabw-Autoklaviert	0,000	0,000	0,000	0,000	0,463	0,463	0,000
Gamma	26,500	14,125	7,875	4,625	3,375	2,500	1,750
Stabw-Gamma	14,919	8,236	5,357	3,021	1,923	1,604	1,165
Zellen	0,857	0,000	0,429	0,286	0,857	1,429	1,286
Stabw-Zellen	0,378	0,000	0,535	0,488	0,378	1,512	0,756

	8	9	10	11	12	13	14
Autoklaviert	1,500	1,500	2,000	1,625	1,625	1,500	1,500
Stabw-Autoklaviert	0,535	0,535	0,756	0,518	0,518	0,535	0,535
Gamma	1,625	1,375	1,375	0,875	0,750	0,750	0,750
Stabw-Gamma	1,061	0,744	0,744	0,641	0,463	0,463	0,463
Zellen	1,286	1,429	1,571	1,000	1,429	1,429	1,429
Stabw-Zellen	0,756	0,535	0,787	0,816	0,535	0,787	0,535

T-Test				AP			
	1	2	3	4	5	6	7
Auto/Zellen	p < 0,001		p < 0,05	p > 0,05	p < 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Auto/Gamma	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05	p > 0,05
Gamma/Zellen	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p > 0,05	p > 0,05

	8	9	10	11	12	13	14
Auto/Zellen	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Auto/Gamma	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
Gamma/Zellen	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,05	p > 0,05	p < 0,05

Abbildung 4-49 Tabelle AP Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen

Die Tabelle stellt die Mittelwerte ($x=8$ und entsprechender Standardabweichung) der AP Werte (U/l) der humanen Knochenmarkszellkulturen dar. Im unteren Tabellenteil die berechnete Signifikanz, bestimmt durch den t-Test nach Student für unverbundene Stichproben.

Hier ist die Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) direkt angegeben.

Während des gesamten Untersuchungszeitraums konnte nur die Kulturen „ γ -bestrahlt 25kGy“ eine Erhöhung der alkalischer Phosphatase an den Mediumwechseln 1, 2, und 3 nachgewiesen werden (entspricht den Tagen 2,4 und 6 nach Aussaat). Das Maximum wurde gleich am 1. Mediumwechsel (Tag 2 nach Aussaat) erreicht. Danach sanken die Konzentration ab dem 4. Mediumwechsel auch in den Kulturen „ γ -bestrahlt 25kGy“ unterhalb von 5U/l. Auf eine Darstellung der Ergebnisse wurde deshalb ab dem 18. Mediumwechsel (entspricht Tag 36 nach Aussaat) verzichtet (Abb.4-48;4-49).

4.2.10 pH-Wert-Änderungen im 12-Wochen-Versuchdesign

Um die Beeinflussung der verschiedenen Zellkulturen auf den pH-Wert zu verdeutlichen wurde aus jedem Mediumüberstand der pH-Wert (Digital-pH-Meter 646, Fa. Knick) bestimmt (Abb.4-50).

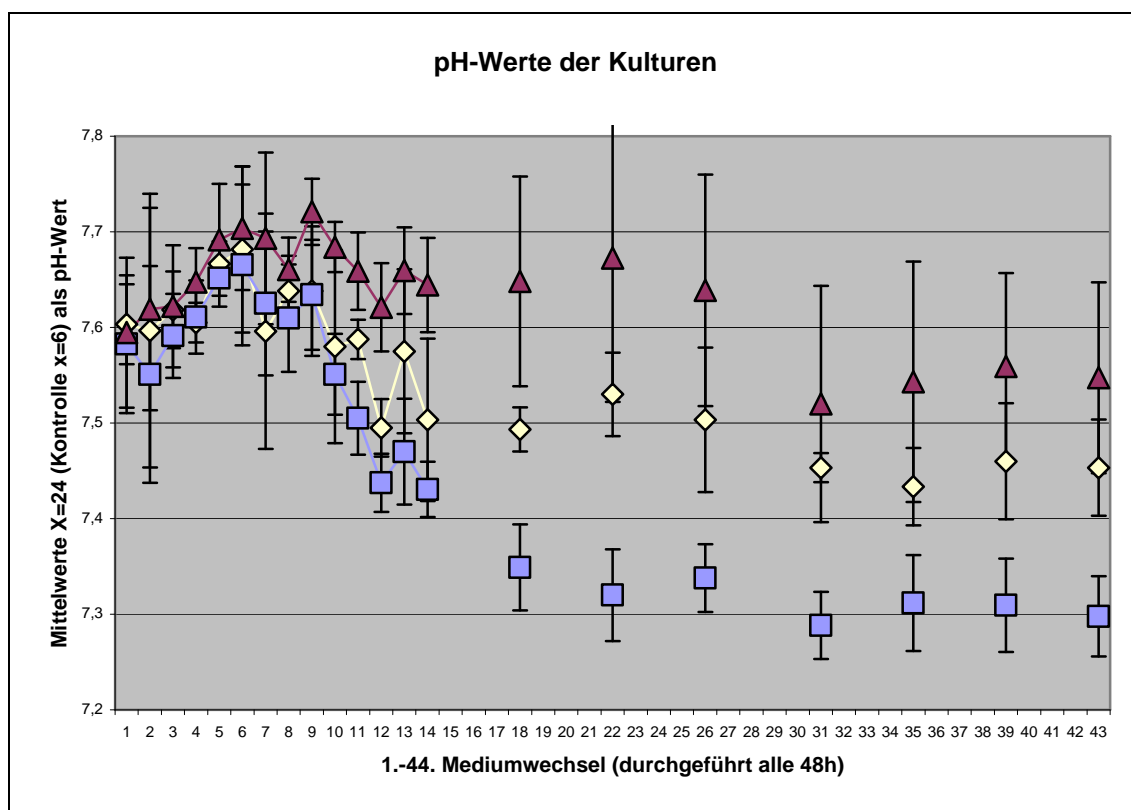


Abbildung 4-50 pH-Werte der verschiedenen humanen Zellkulturen im Kulturverlauf

lila Kulturen 25kGy γ -bestrahlt

blau Kulturen 121°C autoklaviert

gelb humane Knochenmarkszellkontrollkulturen

Im Untersuchungszeitraum ließen sich in den Kulturen „autoklaviert 121°C“ im Verlauf immer niedrigere pH-Werte bestimmen, auch die Kontrollkulturen zeigten diese Verläufe. Für die Kulturen „ γ -bestrahlt 25kGy“ zeigten sich keine größeren Veränderung des pH-Wertes.

4.2.11 Mikroskopische Bilder

Direktfärbung der Kulturen nach Giemsa

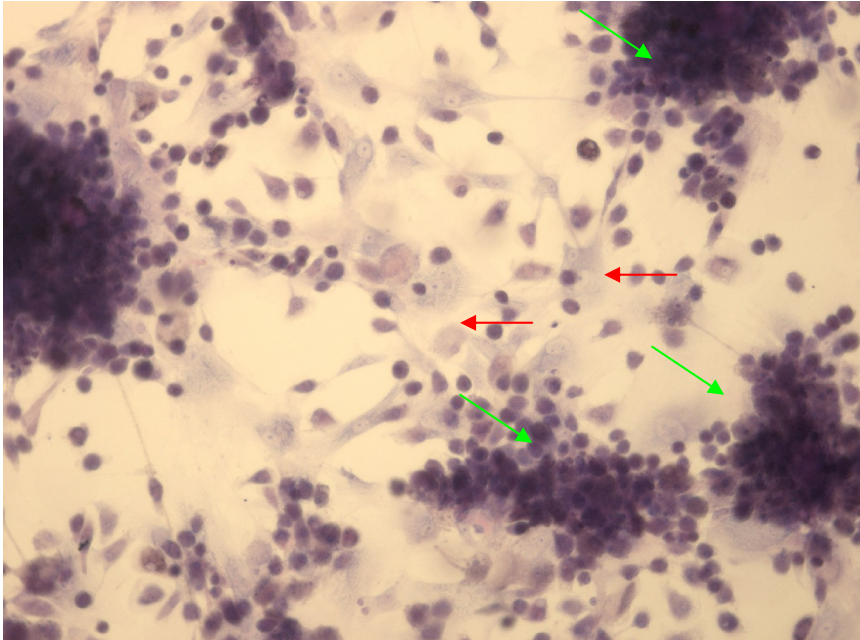


Abbildung 4-51 humane Knochenmarkszellen einer der Kontrollkulturen, 84 Tage nach Aussaat, Giemsa-Färbung, Vergrößerung 100x, Auflichtmikroskopie

Es stellen sich Zellhaufen dar (grüne Pfeile), die Zellen die sich nicht in Zellhaufen befinden, sind zum Teil ausgebreitet (roter Pfeil).

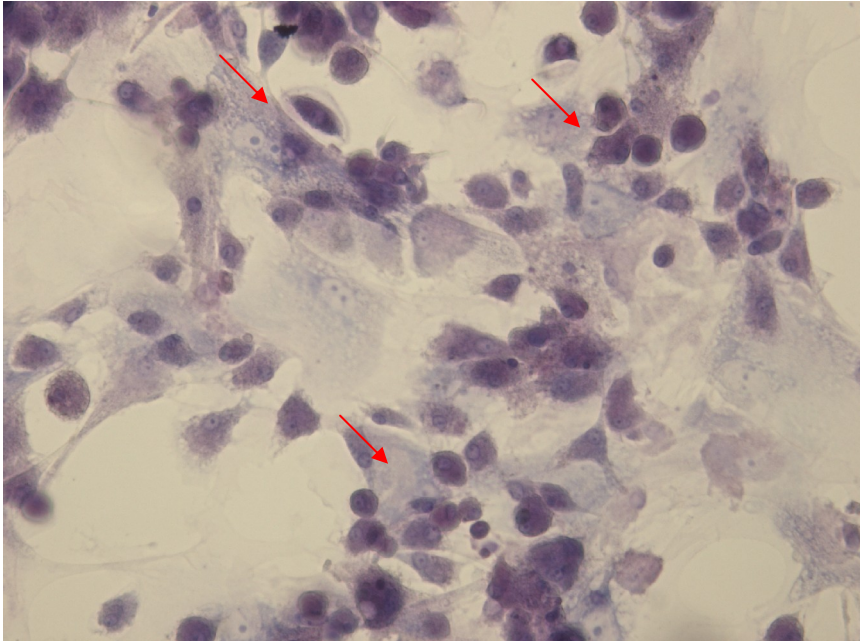


Abbildung 4-52 humane Knochenmarkszellen der Kontrollkulturen, 84 Tage nach Aussaat, Giemsa-Färbung, Vergrößerung 200x, Auflichtmikroskopie

In der Vergrößerung lassen sich unterschiedlich geformte Zellen (rote Pfeile) erkennen, die teils ausgebreitet, teils abgerundet sind.

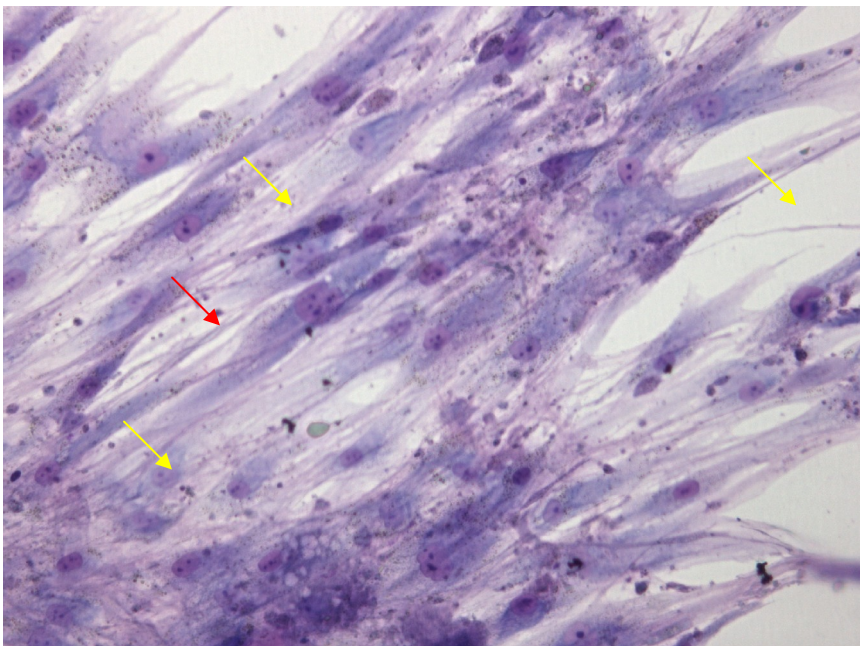


Abbildung 4-53 humane Knochenmarkszellen kultiviert auf 121°C autoklavierten Knochenproben, 84 Tage nach Aussaat, Giemsa-Färbung, Vergrößerung 200x, Auflichtmikroskopie

In der Vergrößerung erkennt man ein interkonnektierendes Netzwerk (roter Pfeil), sowie unterschiedlichste Zelltypen mit Zellkernen, abgerundet oder ausgebreitet (gelbe Pfeile).

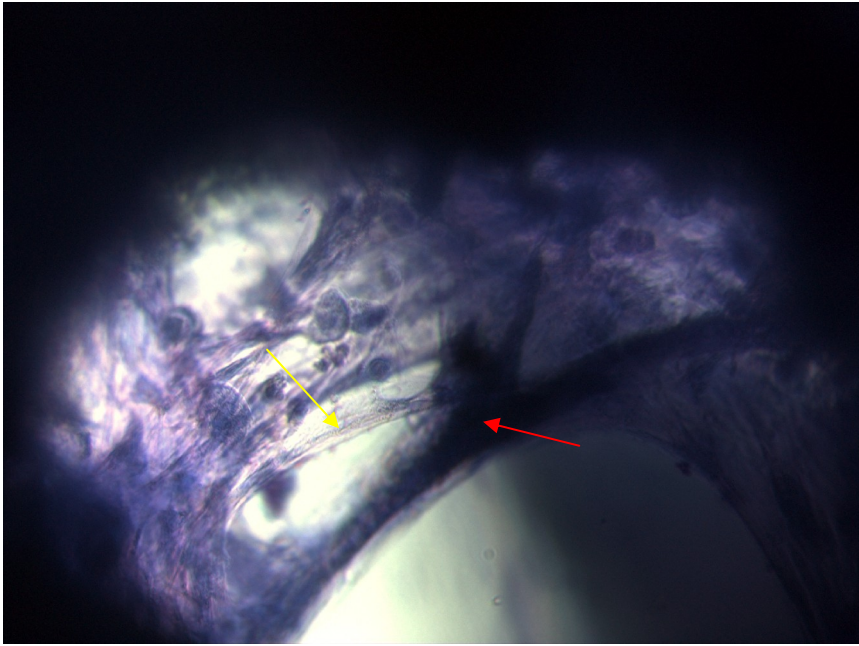


Abbildung 4-54 121°C autoklavierte Knochenprobe mit humanen Knochenmarkszellen, 84 Tage nach Aussaat, Giemsa-Färbung, Vergrößerung 200x, Auflichtmikroskopie

Zwischen Knochentrabekeln (rote Pfeile) finden sich aufspannende Zellen (gelbe Pfeile) in Adhärenz zum Knochen.

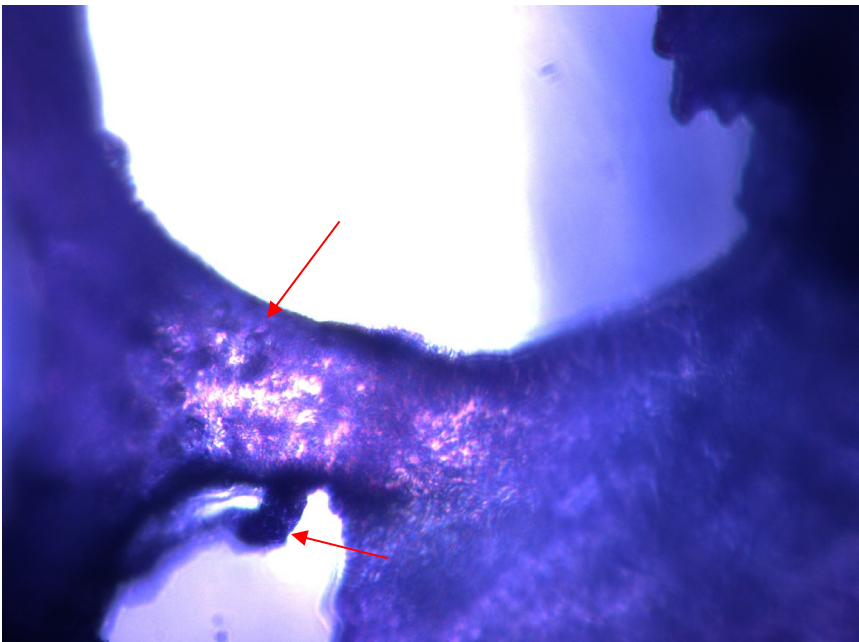


Abbildung 4-55 25kGy γ -bestrahlte Knochenprobe mit humanen Knochenmarkszellen, 84 Tage nach Aussaat, Giemsa-Färbung, Vergrößerung 200x, Auflichtmikroskopie

Zwischen Knochentrabekeln (roter Pfeil) sind keine humanen Knochenmarkszellen nachweisbar.

Nach der Direktfärbung der Kulturen nach Giemsa lassen sich auf den humanen Knochenmarkskontrollkulturen Zellen mit unterschiedlich blau gefärbten Zellkernen darstellen. Daneben erkennt man ein interkonnektierendes Netzwerk und Matrixstrukturen (zartrosa bis rosa) (Abb.4-51;4-52). Auch die Kulturen auf behandelten Knochenproben „autoklaviert 121°C“ zeigen dieses morphologische Zellbild (Abb.4-53) und sich zwischen den Trabekeln aufspannende Matrixstrukturen (Abb.4-54).

Nur den Knochenproben der Kulturen „ γ -bestrahlt 25kGy“ sind keinerlei Zellen oder interkonnektierende Netzwerke nachweisbar (Abb.4-55).

Färbung der Technovit-Dünnschnitte:

modifizierte „von-Kossa-Versilberung“ nach Krutsay

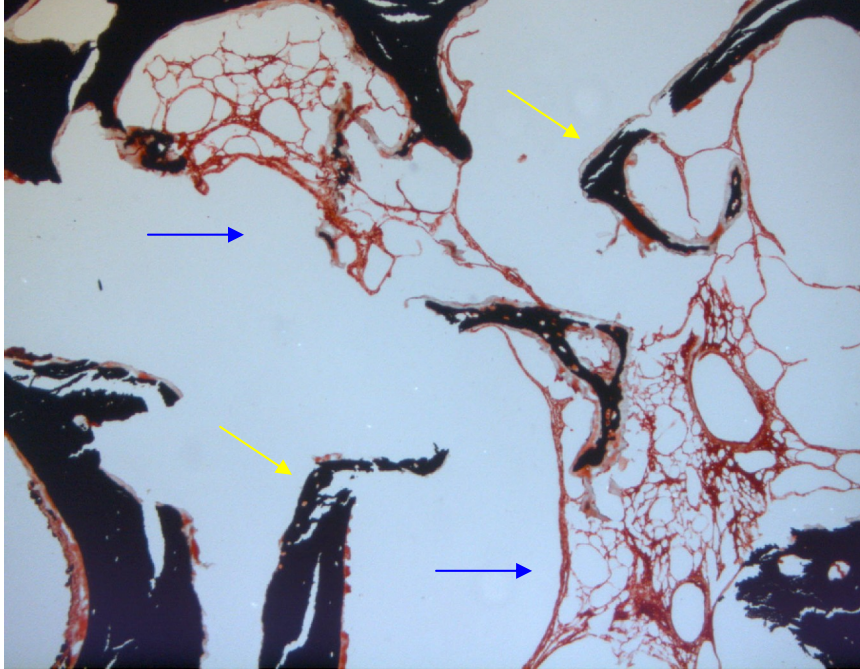


Abbildung 4-56 Dünnschnitt in Durchlichttechnik einer Knochenprobe „autoklaviert 121°C“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 50x, von-Kossa-Färbung

In der von-Kossa-Färbung erkennt man sich zwischen den Trabekeln (schwarze Strukturen) der Knochenprobe (gelbe Pfeile) sich aufspannende kollagene Strukturen (blauer Pfei – rote Strukturen).

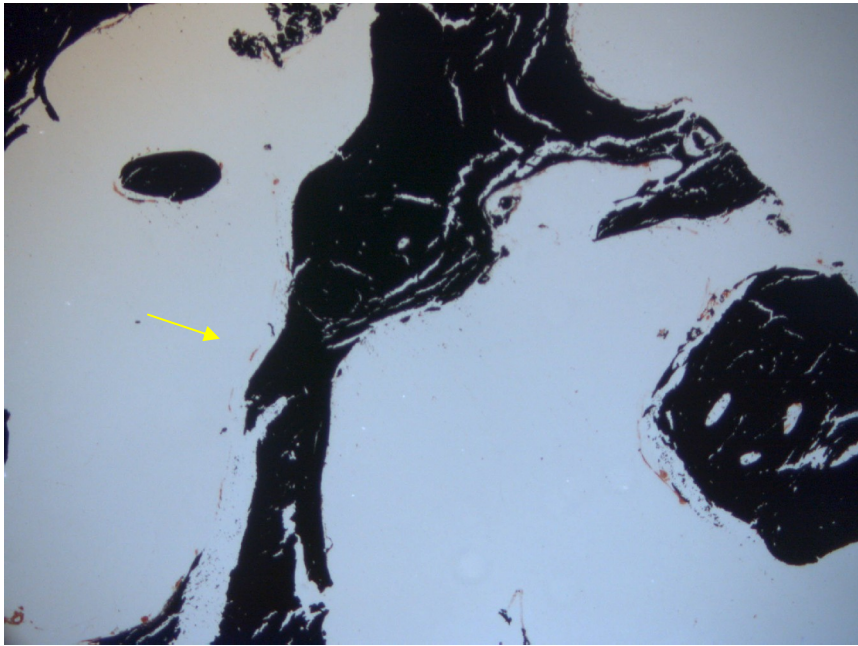


Abbildung 4-57 Dünnschnitt in Durchlichttechnik einer Knochenprobe „ γ -bestrahlt 25kGy“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 50x, von-Kossa-Färbung

In der von-Kossa-Färbung kein Nachweis für Zellen oder kollagene Strukturen zwischen den Trabekeln (schwarze Strukturen) der Knochenprobe (gelber Pfeil).

Giemsa-Färbung

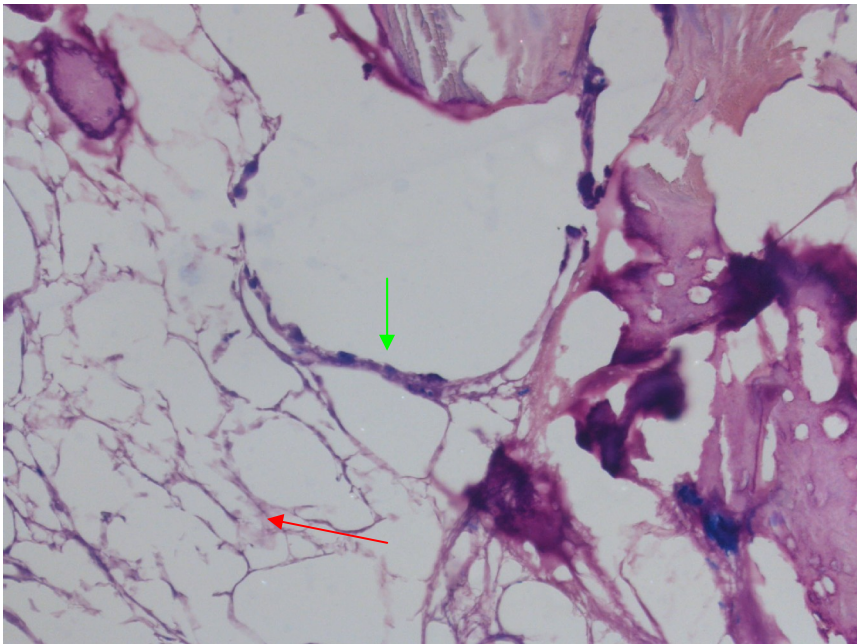


Abbildung 4-58 Dünnschnitt in Durchlichttechnik einer Knochenprobe „autoklaviert 121°C“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 100x, Giemsa-Färbung

Kollagene Strukturen (roter Pfeil) und Zellverbände (grüner Pfeil) sind zu erkennen.

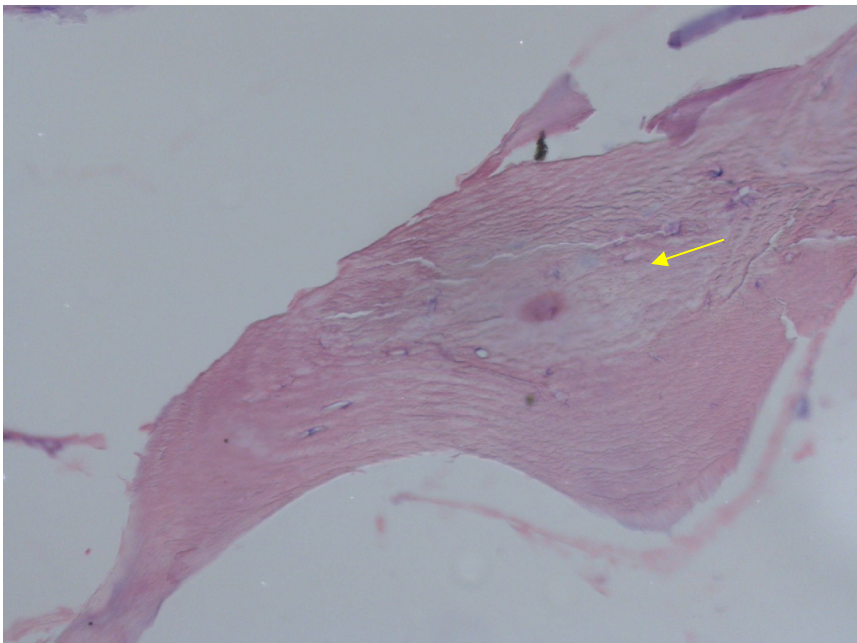


Abbildung 4-59 Dünnschnitt in Durchlichttechnik einer Knochenprobe „ γ -bestrahlt 25kGy“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 100x, Giemsa-Färbung

Keine Matrixbildung, man erkennt den 25kGy γ -bestrahlten Knochen der Knochenprobe (gelber Pfeil).

Hämalaun-Eosin Doppelfärbung (H&E)

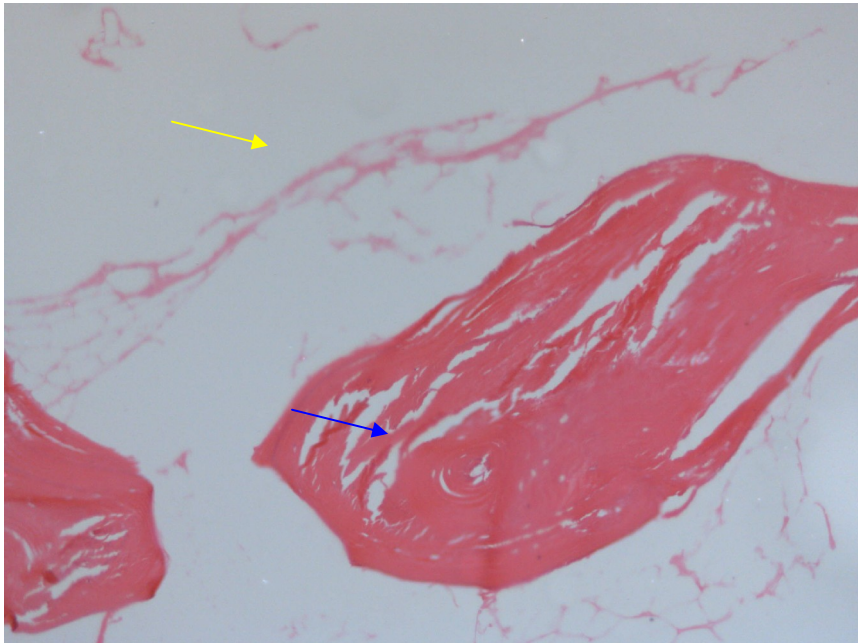


Abbildung 4-60 Dünnschnitt in Durchlichttechnik einer Knochenprobe „autoklaviert 121°C“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 100x, H&E-Färbung

Kein Hinweis für Zellen, jedoch kollagene Strukturen (gelber Pfeil) und Knochen der Knochenprobe (blauer Pfeil).

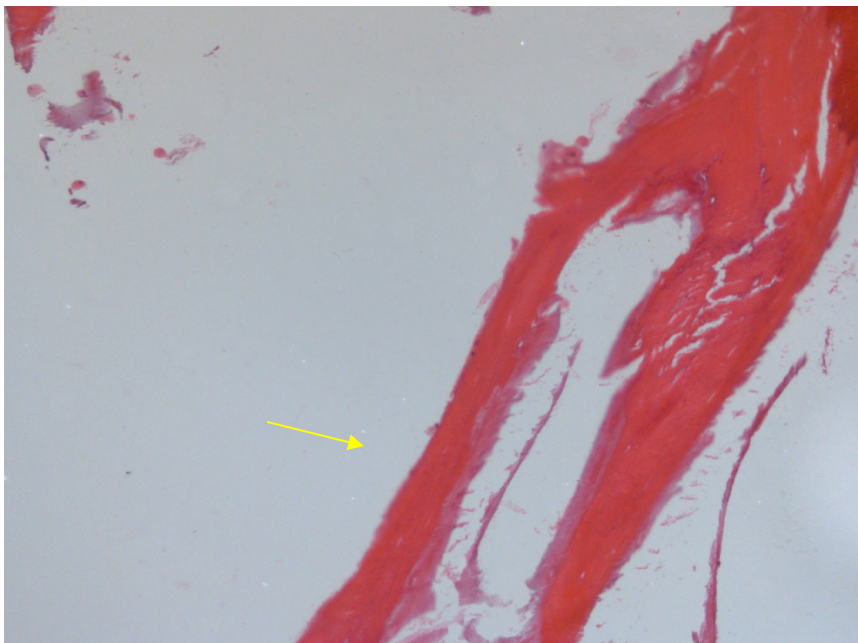


Abbildung 4-61 Dünnschnitt in Durchlichttechnik einer Knochenprobe „ γ -bestrahlt 25kGy“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 100x, H&E-Färbung

Keine Matrixbildung, man erkennt den 25kGy γ -bestrahlten Knochen der Knochenprobe (gelber Pfeil).

4.2.12 Rasterelektronische Bilder der Zellkulturen nach 12 Wochen

Bilder einer humanen Knochenmarkszellkontrollkultur

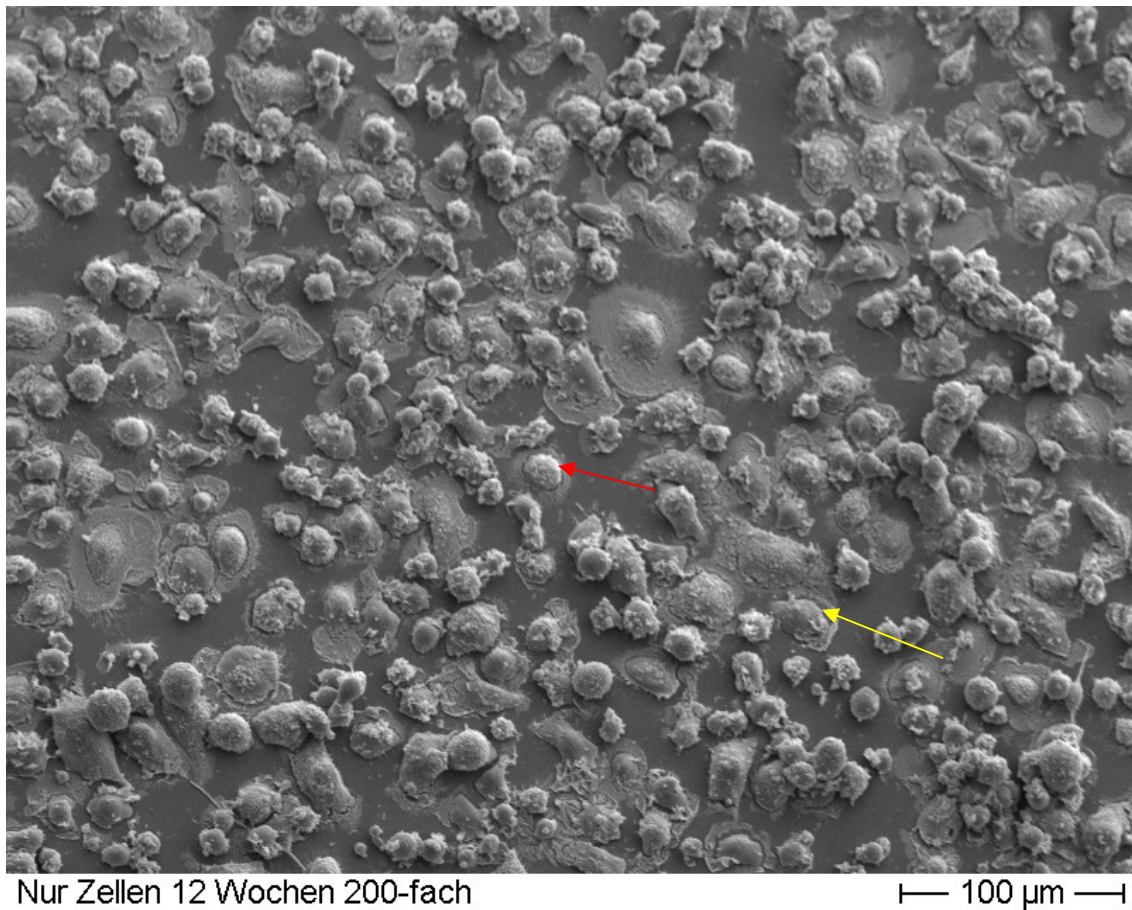
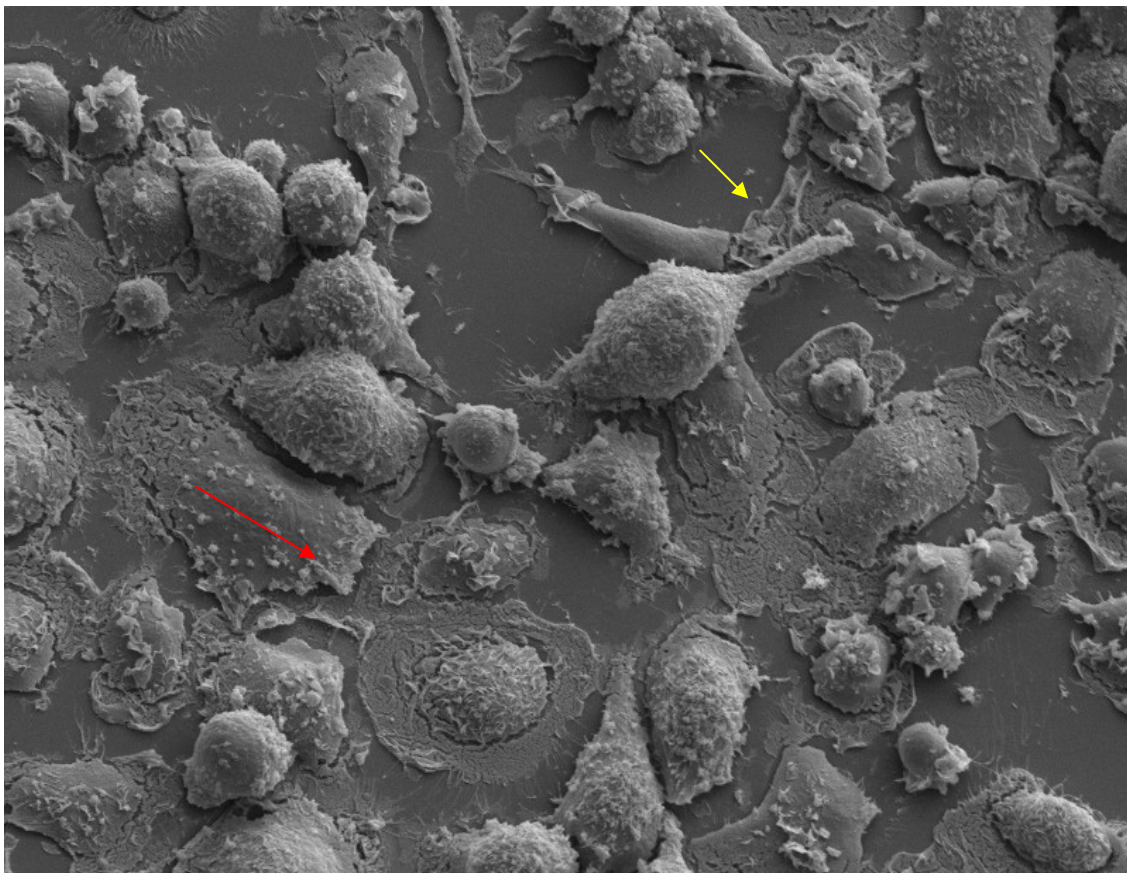


Abbildung 4-62 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Kontrollkultur humaner Knochenmarkszellen, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 200x

Nach drei Monaten Kulturdauer zeigen die humanen Knochenmarkszellen einen Zellrasen mit abgerundeten (roter Pfeil) und ausgebreiteten (gelber Pfeil) Zellen.



Nur Zellen 12 Wochen 450-fach

60 μm

Abbildung 4-63 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Kontrollkultur humaner Knochenmarkszellen, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 450x

Die humanen Knochenmarkszellen bilden Zytopodien (gelber Pfeil). Die Oberfläche wird zum Teil mit extrazellulärer Matrix bedeckt (roter Pfeil).

Bilder der bei 121°C autoklavierten Knochenprobenkörper nach Zellkultur

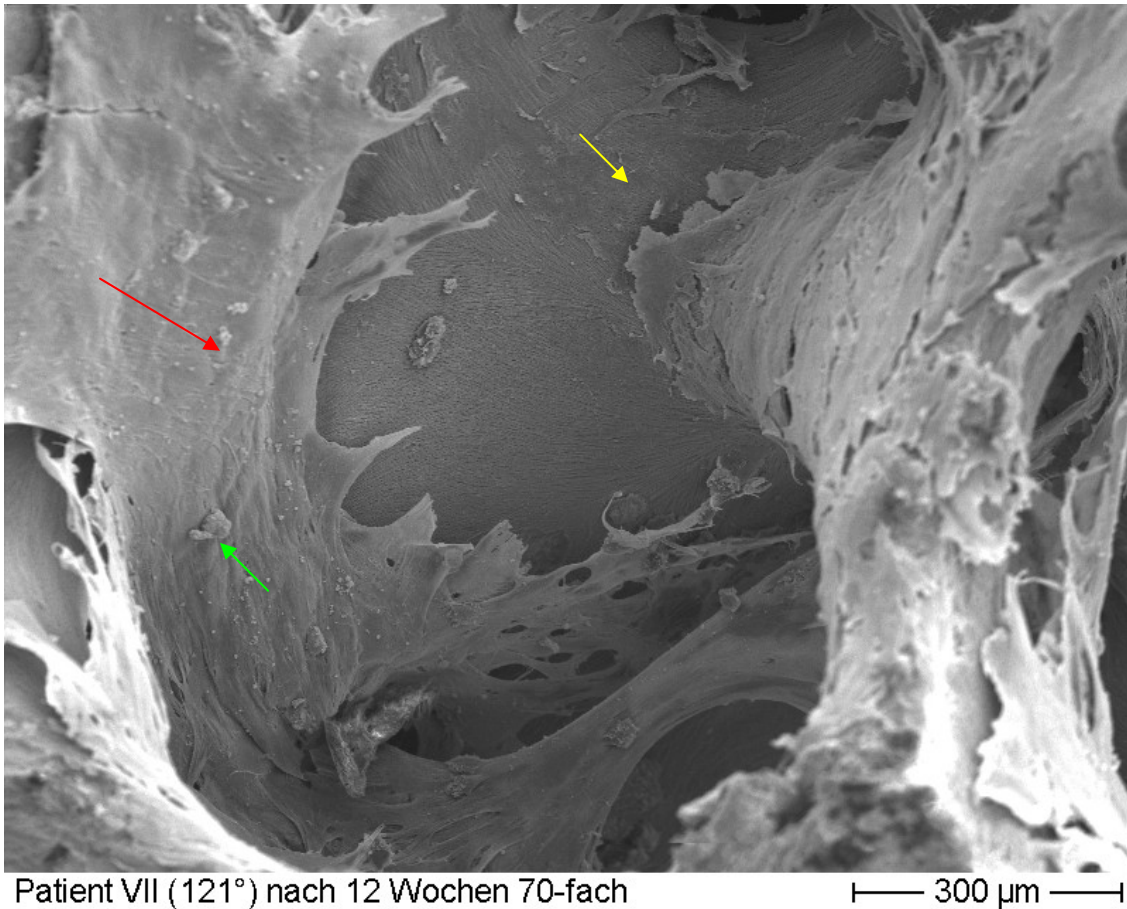


Abbildung 4-64 Rasterelektronmikroskopische Aufnahme einer Knochenprobe „autoklaviert 121°C“ mit humanen Knochenmarkszellen, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 70x

Man kann auf der Knochenprobe extrazelluläre Matrix (roter Pfeil) erkennen, darauf kleine runde Zellen (grüner Pfeil) und Knochen der Knochenprobe (gelber Pfeil).

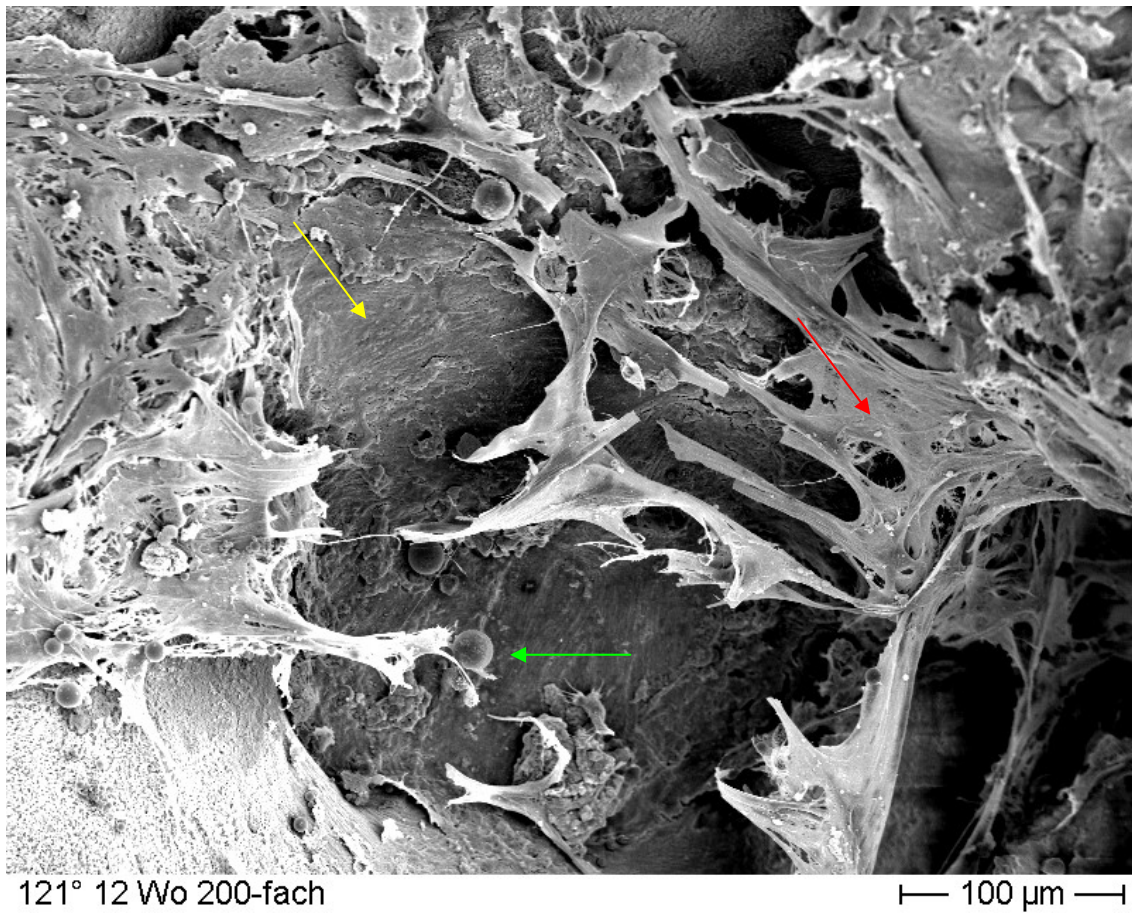


Abbildung 4-65 Kultur Rasterelektronmikroskopische Aufnahme einer Knochenprobe „autoklaviert 121°C“ mit humanen Knochenmarkszellen, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 200x

Man kann auf der Knochenprobe extrazelluläre Matrix (roter Pfeil) erkennen, darauf kleine runde Zellen (grüner Pfeil) und Knochen der Knochenprobe (gelber Pfeil)

Bilder der 25kGy γ -bestrahlten Knochenprobenkörpern nach Zellkultur

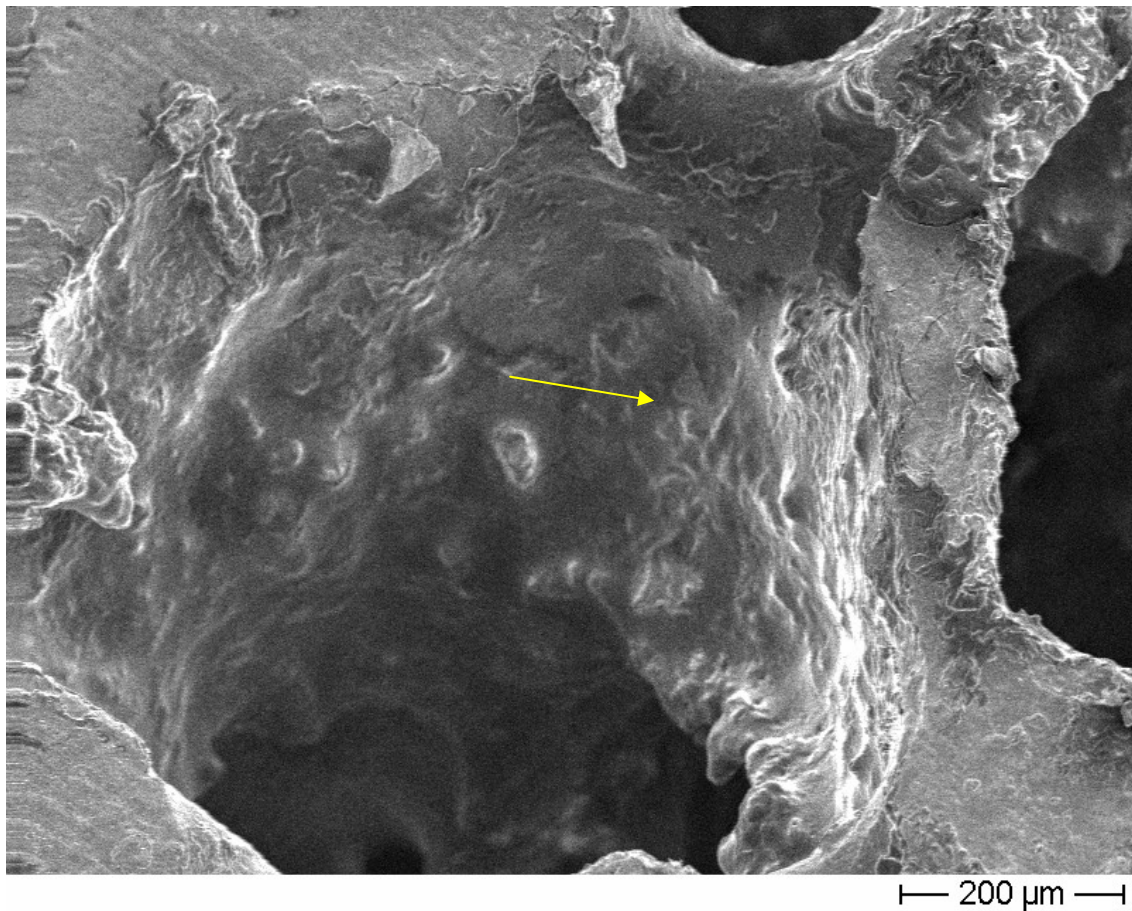


Abbildung 4-66 Rasterelektronmikroskopische Aufnahme einer Knochenprobe „ γ -bestrahlt 25kGy“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 100x

Man erkennt den Knochen der behandelten Knochenprobe (gelber Pfeil), jedoch keinen Hinweis für die Bildung einer extrazellulären Matrix oder adhärenter Zellen.

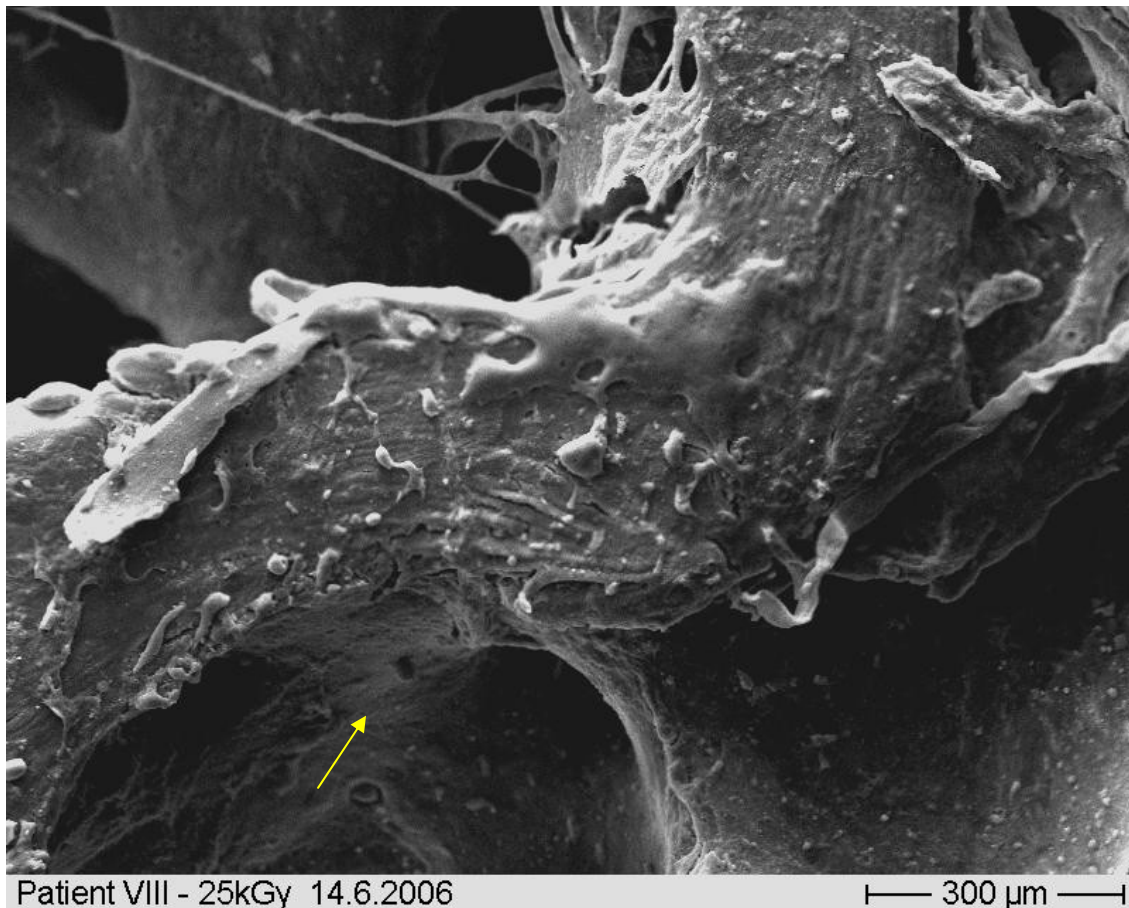


Abbildung 4-67 Rasterelektronmikroskopische Aufnahme einer Knochenprobe „ γ -bestrahlt 25kGy“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 100x

Man erkennt den Knochen der behandelten Knochenprobe (gelber Pfeil), jedoch keinen Hinweis für die Bildung einer extrazellulären Matrix oder adhärenter Zellen.

Bei den 121°C autoklavierten Knochenproben zeigte sich ein Einwachsen der Zellen in die spongiösen Strukturen hinein. Auf den 25kGy γ -bestrahlten Knochenproben konnten nur vereinzelt Zellen nachgewiesen werden.

Ein neugebildetes, faseriges Netzwerk war bei den 25kGy γ -bestrahlten Proben im Gegensatz zu den 121°C autoklavierten Knochenproben nicht nachzuweisen.

5 Diskussion

Im Vergleich der humanen Knochenmarkszellkulturen auf den behandelten allogenen Knochentransplantaten, die durch die beiden Sterilisationsverfahren behandelt wurden, konnten unterschiedliche Veränderungen auf die gemessenen Labor- und untersuchten Zellfunktionsparameter (hier IL – 1 β , IL – 6, INF- γ , TNF – α , Lactat, LDH, alkalische Phosphatase, FACS-Analyse, Zellzahlen und pH-Wert) nachgewiesen werden.

Bereits bei der mikroskopischen Verlaufsbeobachtung der verschiedenen Zellkulturen zeigten sich klare Unterschiede zwischen den Kontrollkulturen und den beiden Testgruppen. Die humanen Knochenmarkszellen auf den 121°C behandelten autoklavierten Knochen zeigten ein gutes Proliferationsverhalten, sie setzten sich ab, bildeten am Wellboden und auf den behandelten allogenen Knochentransplantaten interkonnektierende Netzwerke und einen bedeckenden Zellrasen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten hier mikroskopisch keine Unterschiede festgestellt werden. Die 25kGy γ -bestrahlten Kulturen zeigten sich ungleich schlechter, nur vereinzelt konnten überhaupt Zelladhärenzen nachgewiesen werden, ein Zellrasen war nicht nachweisbar.

Diese unterschiedlichen Adhäsionsprozesse wurden durch verschiedenste Faktoren beeinflusst. Zum Beispiel zeigten Hofmann et al. in einer ähnlichen *in vitro* Studie, hier wurde jedoch eine Osteoblastenzellkultur benutzt, dass die Höhe der Temperaturbehandlung der Knochenmatrix Auswirkungen auf die Adhäsion der Zellen hat.

Zwar wurde in diesem Versuchansatz die Plating efficiency nur in den ersten Stunden ausgewertet, doch bewerteten diese ebenfalls die Proliferation der Zellen und führten eine MTT-Analyse durch [Hofmann et al. 2000].

Das Proliferationsverhalten der 121°C autoklavierten Testgruppen konnte in unserem Versuchsansatz die Beobachtungen der Arbeitsgruppe Hofmann bestätigen. Eine Behandlung mit besonders hohen Temperaturen führt dazu, daß in serumhaltigen Medium die Zelladhäsion verlangsamt erfolgt [Hofmann et al. 2000].

25kGy γ -bestrahlte Knochentransplantate wurden in der Studie von Hofmann et al. nicht getestet. Die Vermutung, dass bei der γ -Bestrahlung ebenfalls sehr hohe Temperaturen entstehen, die die schlechten Adhäsions- und Proliferationsergebnisse dieser Testgruppen erklären könnten, bestätigte sich nicht. Während der Bestrahlung und der Prozessierung der 25kGy γ -bestrahlten Knochentransplantaten ist von einer

Temperaturverschiebung von höchstens 10°C auszugehen. In unserem Fall lag damit das Temperaturmaximum bei < 40°C [BGS Beta-Gamma-Service GmbH&Co.KG].

Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder der Testgruppen nach 12 Wochen zeigten für beide Verfahren eine unterschiedliche Adhäsion von Zellen in den spongiösen Zwischenräumen.

Die 121°C autoklavierten Knochenprobenkörper zeigten spindelförmige Zellmorphologien. Weiterhin konnten sich aufspannende Matrixstrukturen zwischen den Trabekeln erkannt werden. Diese Beobachtungen fanden sich ebenfalls in den mikroskopischen Bildern der Direktfärbung nach Giemsa. Die 25kGy γ -bestrahlten Knochenprobenkörper fielen durch eine Verminderung von Zellen und das Fehlen faseriger Netzwerke auf. Auch die durchgeführten histologischen Schnittbilder und die Direktfärbung nach Giemsa bestätigten diese Beobachtungen.

Vergleicht man allein die Knochenprobenkörper der beiden Testgruppen, zeigten sich ebenfalls Unterschiede.

An den 121°C autoklavierten Knochenprobenkörper konnten nach erfolgreichem Sterilisationsverfahren Rissbildungen im Trabekelwerk und glasuhrähnliche Veränderungen der Oberfläche, vermutlich bedingt durch Alteration der Kollagenfibrillen, festgestellt werden. Diese Veränderungen waren als Folge der reinen Präparation auszuschließen. Unserer Ergebnisse bestätigten damit Studien, die Mikrofrakturen im Hydroxylapatit des Knochens bei Temperaturen von >80°C und vermehrt bei Temperaturen >120°C beschrieben [Kyoto Universität 1991 und 2001; Voggenreiter et al. 1994].

An den 25kGy γ -bestrahlten Knochenprobenkörpern konnten keine morphologischen Schäden festgestellt werden. Auch dies bestätigte frühere elektronenmikroskopische Studien an kortikaler Rattentibia [Voggenreiter et al. 1994].

Bei der Vitalitätsbestimmung durch Trypanblaufärbung nach 28 Tagen konnten nach Ablösung von den 25kGy γ -bestrahlten Knochen nur 35,8% der Zellen als lebend gewertet werden. Ein zunächst angenommener Verbleib der Zellen im Matrixverband nach der Zelllösung durch Accutase in diesen Kulturen bestätigte sich nicht. Auflichtmikroskopisch waren auf den Knochenprobenkörper in der Trypanblaudirektfärbung nach der Accutaseablösung nur noch vereinzelt Zellen nachweisbar.

Die Zellzahlmessungen aus den Mediumüberständen am CASY®-Zellzähler ergaben in den ersten Kulturtagen in den 25kGy γ -bestrahlten Kulturen eine enorme Zunahme von Zelltrümmern und avitalen Zellen. Damit schien ein Zelluntergang in diesen Kulturen zu Beginn des Versuchansatzes stattgefunden zu haben. Die höchstsignifikant ($p < 0,001$) hohen LDH Unterschiede der γ -bestrahlten Kulturen zu den Ergebnissen der Kontroll- und autoklavierten Kulturen an den ersten beiden Mediumwechseln bestätigten diese Vermutung.

In der Vitalitätsbestimmung durch Trypanblaufärbung zeigten die Zellen der 121°C autoklavierten Kulturen nach Ablösung durch Accutase mit 66,7% eine gute Vitalität. Es muss aber von einer noch höheren Zahl vitaler Zellen ausgegangen werden, da durch die Trypanblaudirektfärbung nach Accutaseablösung ein Verbleib der Zellen im Matrixverband nachgewiesen werden konnte. Die Messungen aus den Mediumüberständen am CASY®-Zellzähler ergaben zu Beginn des 12-Wochenversuchansatzes einen Peak von vitalen Zellen in den 121°C autoklavierten Kulturen. Dieser Verlust an vitalen Zellen war in den Kontrollkulturen nicht nachweisbar. Als Ursprung hierfür war ein mechanisches Problem beim Mediumwechsel anzunehmen, welches durch Scherbewegungen der unfixierten Knochenprobenkörper am Wellboden verursacht wurde. Die Messunterschiede relativierten sich über die Versuchsdauer, da die Knochenprobenkörper durch Zellbrücken, Matrixbildung und Pseudopodien der Zellen zunehmend fixiert wurden.

Die 121°C autoklavierten Kulturen verzeichneten ab dem zweiten Mediumwechsel einen Anstieg der LDH im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Die hoch bis höchstsignifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und autoklavierten Kulturen ($p < 0,01$; $p < 0,001$) sprachen für eine durch das Knochenmaterial ausgelöste Reaktion der Zellkulturen, die mit einem erheblichen Zelluntergang verbunden war. Jedoch schien dieser über den Kulturverlauf hoch bleibende Wert durch die Zellkultur kompensiert. Im zweiten und dritten Monat kam es sogar zu einem Abfall der LDH Werte in den autoklavierten Kulturen, also einer Annäherung an die Werte der Kontrollkulturen. Ein gesteigerter Zellumsatz und Zelluntergang in den 121°C autoklavierten Kulturen war somit gegen Ende des ersten Versuchsmonats zu verzeichnen.

Auch die gemessenen Lactat- und pH-Spiegel korrelierten in den Kulturen eng mit den gemessenen LDH Werten. Die relativ niedrigen Ergebnisse der pH-Werte in den Kontroll- und 121°C autoklavierten Kulturen sprachen für einen erhöhten Stress bzw.

einen gesteigerten Zellumsatz in diesen Kulturen. Hinweise für z.B. osteoklastäre Umbauten an den Knochentransplantaten könnten hierfür eine Erklärung sein. Die gemessenen Lactat-Werte sprachen für einen eventuellen Sauerstoffmangel in den Kulturen. Ein häufigerer Mediumwechsel könnte hier ggf. eine Lösung darstellen, da die Zellkultur hier der Situation *in vivo*, d.h. Nähr- und Sauerstoffversorgung durch den Blutkreislauf, nicht optimal nachbildete.

Die Laborparameter die in unserem Versuchdesign Aussagen über die Beteiligung der immunologisch relevanten Zellen machen sollten, sind zum einen das Zytokinprofil, zum anderen die durchflußzytometrische Analyse der humanen Knochemarkszellkulturen. Es war bekannt, dass die Expression der Zytokine IL-1 β , IL-6, INF- γ und TNF- α durch immunkompetente Zellen den Knochenstoffwechsel beeinflussen können [Canalis 1986, Vaes 1988, Zheng et al. 1992].

Schratt et al. konnten über eine gering ausgeprägte Immunreaktion bei strahlensterilisierten Knochentransplantaten in einem Tier-Modell mit Ratten berichten. Im gleichen Experiment zeigten autoklavierte Knochentransplantate keine Immunreaktion im Beobachtungszeitraum. Beobachtungsparameter war hier jedoch die Milzhistomorphologie, sowie der Leukozyten-Migrations-Inhibitionstest (LMI). Vermutet wurde, dass nicht allein die osteoinduktiven, sondern auch die noch vorhandenen antigenen Eigenschaften des behandelten Knochentransplantats wichtig für das Einwachsverhalten der sterilisierten Knochentransplantaten waren [Schratt et al. 1997].

Den bekannten Einfluß der Zytokine Il-1 und TNF- α auf die Hämostasis und das Knochenremodelling, speziell der Osteoklastenregulation [Kobayashi et al. 2000, Kim et al. 2005], konnten Kon et al. ebenfalls in einer Knochenfrakturstudie nachweisen [Kon et al. 2001]. Kon et al. bestimmten in dieser Frakturstudie an BALB/c Mäusen unter anderem die Expression der Zytokine Il-1 und TNF- α und deren Rezeptoren. Dabei zeigten sich eine Hochregulation von Il-1 und TNF- α , sowie ein Einstrom von immunkompetenten Zellen 24 Stunden nach einem Frakturtrauma [Kon et al. 2001].

Unser Versuchansatz konnte die oben beschriebene Immunmodulation im Tierversuch nicht bestätigen. Zwar waren erhöhte Werte von Il-1 und TNF- α am ersten Mediumwechsel in den Kontrollkulturen und in den 121°C autoklavierten Kulturen nachweisbar, jedoch nicht signifikant. Unser *in vitro* Modell schien hier nicht in der Lage die Messparameter des obigen Tierversuchs nachzuvollziehen.

Jedoch sprach das Ausbleiben einer maximalen Il-1 Ausschüttung gegen eine knochendestruktive Infektion in den Kulturen. Sasaki et al. berichteten über einen solchen Zusammenhang, d.h. die Höhe der Il-1 Ausschüttung und der Knochendestruktion, in einem *in vivo* Infektionsmodell an Mäusen [Sasaki et al. 2000 und 2004].

Als Zytokin mit inhibitorischen Effekt wurde versucht IFN- γ aus den Mediumüberständen zu bestimmen. In unseren Kulturen konnte kein signifikanter IFN- γ Nachweis gemessen werden. Ein möglicher hemmender Einfluss auf die Osteoklastendifferenzierung durch IFN- γ war deshalb in allen Kulturen nicht anzunehmen. Sasaki et al. untersuchten in diesem Zusammenhang in einem *in vivo* Infektionsmodell an IFN- $\gamma^{-/-}$ Knockoutmäusen, ob es bei einem Wegfall einer möglichen inhibitorischen IFN- γ -Wirkung zu einer signifikanten Erhöhung einer infektinduzierten Knochenresorption käme. Eine signifikant erhöhte Knochenresorption konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden [Sasaki et al. 2004].

Die Zytokinbestimmungen in den 25kGy γ -bestrahlten Kulturen lagen für alle Zytokine unterhalb der Nachweisgrenze.

Betrachtet man die Zytokinprofile des Il-6, so liessen sich signifikante Unterschiede nachweisen.

Nach initial hohen Werten am ersten Mediumwechsel (entspricht Tag 3 nach Aussaat) fielen die Il-6 Werte in den Kontroll- und autoklavierten Kulturen ab, um dann ab dem sechsten Mediumwechsel (entspricht Tag 12 nach Aussaat) anzusteigen. Vergleicht man die gemessene Expression an Il-6 in den autoklavierten Kulturen mit den Kontrollkulturen waren diese hierbei immer signifikant höher, mit einem Maximum und höchstsignifikanten Unterschied von $p < 0,001$ am 14. Mediumwechsel (entspricht Tag 28 nach Aussaat). Diese Il-6 Verläufe wurden ebenfalls in einem Tiermodell an Ratten beobachtet. Cho et al. testeten in dieser Frakturstudie ein Distraktionsmodell. Initial kam es in dieser Studie am Operationstag zu einer erhöhten Il-6 Expression nach Corticotomie, weiterhin zu einem Absinken der Il-6 Expression und einem Anstieg nach Distraktionsreiz [Cho et al. 2007]. Verschiedenste Zellen, z.B. Monozyten, Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten etc., sind in der Lage Il-6 zu exprimieren [Ibelgauft 2003]. Il-6 ist dabei ein multifunktionelles Zytokin, welches in der Lage ist verschiedenste Effekte auf hämatopoetische Zellen, wie mesenchymale Zellen, Osteoklasten, T- und B-Lymphozyten etc. auszuüben. Die Il-6 Wirkung auf den Knochenstoffwechsel konnte in

verschiedenen Studien gezeigt werden. Roodman beschrieb, stützend auf die Arbeiten von Kurihara et al., dass eine Osteoklastentätigkeit über die direkte Wirkung von Il-6 auf osteoklastäre Vorläuferzellen möglich ist [Roodmann 2006, Kurihara et al. 1990]. In unserem Versuchansatz werteten wir eine Erhöhung der Il-6 Werte in den Kulturen als Zeichen eines gewünschten Remodelling am Knochentransplantat. Ein in unserer Arbeitsgruppe unter gleichen Bedingungen durchgeführter Versuchsansatz mit autologen Knochentransplantaten ergab ein ähnliches Il-6 Zytokinprofil mit jedoch signifikant höher gemessenen Werten [Herzberger 2008]. Wie wichtig diese Il-6 gesteuerten Umbauprozesse im Knochenstoffwechsel sind zeigte die Arbeitsgruppe um Rozen. In einer Frakturstudie an Ratten konnte durch eine Applikation von Parathormon Fragmenten (PTH 1-34 oder PTH 28-48) in Kombination mit Il-6 und des Rezeptors IL-6sR ein größeres Callusvolumen am Frakturspalt, sowie eine bis zu 300% höhere mechanischen Belastbarkeit des neu gebildeten Knochens erreicht werden [Rozen et al. 2007]. Vermutet wurde, dass zum einen eine Vermehrung von Knorpel erreicht werden müsse, der als Basis für eine Knochenneubildung dienen könnte. Zum anderen sollte damit die Knochenneubildung unterstützt werden. In einer früheren Studie war die Il-6 modulierte Erhöhung der Knochenumbauprozesse durch Osteoklastenaktivierung im Nacktmausmodell schon nachgewiesen worden [Rozen et al. 2000]. Die Kombination mit Il-6 und dem Rezeptors IL-6sR wirkte in dieser Studie als Verstärker des Knorpel zu Knochen Remodellings [Rozen et al. 2007].

Für unsere Ergebnisse schien das gemessene IL-6 Profil demnach ein physiologisch wie therapeutisch gewünschter Effekt, der nötig für das Einheilen des transplantierten Knochenpräparats sein müßte.

In verschiedenen Studien wurde postuliert, dass hämatopoetische Zellreihen und Lymphozyten Effekte auf den Knochenstoffwechsel haben könnten. Durch ihr Vorkommen im Knochenmark rückten sie gerade bei pathologischen Prozessen in diesem Bereich in den Mittelpunkt der Betrachtung [Sharrock 1998]. Die Interaktion von Skelettsystem und Immunsystem wird auf dem Feld der Osteoimmunologie beforscht. In der Pathogenese der inflammatorisch bedingten Knochenresorption rückte die T-Zelle, sowie deren Transkriptionfaktor (NFATc1), Zytokine und verschiedenste Signalmoleküle ins zentrale Interesse der Osteoklastogenese [Takayanagi 2005].

Ein Beispiel zeigte die Betrachtung der Wirkung von Cyclosporin A auf den Knochenverlust von Ratten, die eine T-Zelldefizienz aufweisen. Buchinsky et al. bewiesen hier, dass für die Cyclosporin A ausgelöste Osteoporose T-Lymphozyten

vorhanden sein müssen. Die T-Lymphozyten schienen in diesem Falle notwendig, um bestimmte Signale des Knochenabbaus zu vermitteln [Buchinsky et al. 1996]. Andere Arbeiten berichteten über ähnliche Ergebnisse in Tierversuchen mit T-Zell-defizienten Nacktmäusen. Ziel hier war es Knochenverluste an den Alveolaren der Tiere nach Endotoxingabe von E.coli Bakterien nachzuweisen. Die T-zell-defizienten Nacktmäuse zeigten zum einen eine verminderte Knochenresorption im Vergleich zu normalen Mäusen, zum anderen vermehrte sich der Knochenverlust nach Gabe von T-Lymphozyten [Ukai et al. 1996]. In einer Folgestudie konnten Hara et al. im gleichen Studiedesign zeigen, dass diese Schlüsselstellung der T-Lymphozyten sowohl für $CD4^+$ als auch für $CD8^+$ T-Lymphozyten galt. Beide Leukozytensubpopulationen schienen als Makrophagenaktivator einen Beitrag in der durch E.coli Endotoxin ausgelösten frühen Knochenresorption zu leisten. Der Knochenverlust war in den Kontrollgruppen ($CD4^+/CD8^+$ -, $CD4^+$ oder $CD8^+$ defizient) signifikant geringer [Hara et al. 1998].

Auch beim Menschen scheinen verschiedenste Krankheiten, die sich durch eine gesteigerte Osteoklastenrekrutierung und -aktivierung auszeichnen, entscheidend durch die Funktion der T-Lymphozyten bestimmt. Beispielsweise sieht Teitelbaum die T-Zelle im Mittelpunkt der postmenopausalen Osteoporose. Durch die Verminderung des Östrogens käme es zu einer Aktivierung von T-Zellen. Wahrscheinlich würde diese Aktivierung durch eine gesteigerte Antigenpresentation über MHC der Klasse II gefördert. Die aktivierte T-Zelle steigere die Expression von $IL-1$ und $TNF-\alpha$, welche in der Lage seien über den RANKL/RANK Signalweg eine Osteoklastendifferenzierung im Knochenmark anzuregen [Teitelbaum 2004].

Trotzdem scheint die Rolle der T-Zellen nicht nur auf die osteoklastäre Seite des Knochenstoffwechsels beschränkt. Rifas et al. berichteten über eine Differenzierung von humanen Knochenmarkszellen in Osteoblasten nach Gabe von aktivierten T-Zellen. Damit scheint die T-Zelle sowohl in der Lage Knochenaufbau, wie auch Knochenabbau bei rheumatoiden Arthritiden anzuregen [Rifas et al. 2003].

Im Rahmen unserer Studie konnten ebenfalls Veränderungen der Leukozytensubpopulationen nachgewiesen werden. Mit Hilfe des Verfahrens der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse konnte eine Phänotypisierung der Leukozytensubpopulationen und deren Reifungsgrad erbracht werden. Bringt man ortsfremdes Material in einen Organismus, hier also die Knochenprobenkörper in die Kulturen, so kommt es zur physiologischen Aktivierung der Abwehr- und Umbaumechanismen. Die Veränderungen des normalen Zellpools der humanen

Knochenmarkszellen zeigten die Aktivierung einer zellulären Immunantwort. Die prozentualen Zellzahlen an T-Zellen, T-Helfer-Zellen, Suppressor- und zytotoxischer T-Zellen, sowie natürlicher Killerzellen verschoben sich.

Im Vergleich zeigten die Kulturen mit 121°C autoklavierten Knochenprobenkörpern höhere ausgezählte Zellzahlen als in den 25kGy γ -bestrahlten Kulturen. Ein massiver Zelluntergang konnte hier nicht erkannt werden.

Im Vergleich zur Kontrolle kam es zu Verschiebungen in den Subpopulationen, d.h. einer Vermehrung von reifen T-Zellen, T-Helfer-Zellen, sowie Suppressor- und zytotoxischer Zellen. Eine Vermehrung von natürlichen Killerzellen blieb aus und der Anteil an B-Zellen ging ebenfalls zurück.

Geht man vom Goldstandard der autologen Kulturen aus, hier kam es zur einer Zunahme der T-Zellen, so verhielten sich die 121°C autoklavierten Kulturen im Zellprofil ähnlich [Endres et al. 2005].

Die Kulturen mit 25kGy γ -bestrahlten Knochenprobenkörpern zeigten eine exzessive Vermehrung von Suppressor- und zytotoxischen Zellen ($p < 0,001$). Auch kam es bei den T-Helfer-Zellen und natürlichen Killerzellen in diesen Kulturen zu höchstsignifikanten Zunahmen der Subpopulationen ($p < 0,001$). Jedoch müssen die Ergebnisse der prozentualen Zellzahlen bei den 25kGy γ -bestrahlten Kulturen aufgrund der niedrigen absoluten Zellzahlen mit Vorsicht interpretiert werden.

Bauend auf die Studien von Buchinsky et al., Ukai et al., Hara et al., sowie die Ergebnisse von Teitelbaum kann man vermuten, dass die Zunahme der T-Zellen eine „gewünschte Reaktion“ der Kulturen darstellt [Buchinsky et al. 1996; Ukai et al. 1996; Hara et al. 1998; Teitelbaum 2004]. Zwar diskutieren diese Studien eher den destruktiven Knochenverlust, doch scheinen diese Zellzusammenhänge auch für das Einheilen von transplantiertem Knochengewebe wichtig.

Die höchstsignifikanten T-Zellerhöhungen in den 121°C autoklavierten Kulturen ($p < 0,001$), sowie das Zytokinprofil der Il-6 Werte sind Kulturprofilveränderungen, die eine Aktivierung, Rekrutierung und Differenzierung von Osteoklasten und deren Vorläuferzellen nach sich ziehen können.

Jedoch ist hier im Zusammenhang nicht allein der knochenabbauende Effekt zu sehen.

Für das Einheilen des Knochentransplantats ist eine maßvolle osteoklastäre Rekrutierung entscheidend. Diese schien durch unsere Ergebnisse im Zytokinprofil und der FACs-Analyse im Fall der 121°C autoklavierten Knochentransplantate gegeben.

Die Fähigkeit der Osteoklasten ossäre Oberflächen durch Resorption, z.B. durch lysosomale Enzyme wie Cathepsin K, aufzubrechen ist nötig, um Osteoblasten das Einwandern in die aufgebrochenen Howship Lakunen zu ermöglichen. Dadurch kann das Knochentransplantat ein- und durchmauert, sowie in den normalen Knochenstoffwechsel mit einbezogen werden [Raisz 1999]. Weiterhin könnte auch eine osteoblastärer Differenzierung durch die T-Zelle getriggert sein, wie es Rifas et al. in seiner Studie bei der rheumatoiden Arthritis zeigen konnte [Rifas et al. 2003].

Ein eventueller Nachweis hierfür durch eine signifikante Erhöhung der alkalischen Phosphatase in unseren Kulturen als früher Osteoblastenmarker konnte nicht gefunden werden. Diese geringe Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde auch in anderen Studien mit Knochenmarkszellkulturen beschrieben [Ciapetti et al. 2006].

Die Ergebnisse der 25kGy γ -bestrahlten Kulturen zeigten eine Diskrepanz zwischen der allgemeinen Studienlage und unseren Ergebnissen,

In Falldarstellungen und kontrollierten klinischen Studien wurde über die erfolgreiche Inkorporation von bestrahlten, allogenen Knochentransplantaten berichtet. Verschiedene radiologische und klinische Differenzierungsmethoden wurden hierzu angewandt.

Zwar wurden auch Bedenken über das Ausbleiben von Remodellingprozessen in bestrahlten Knochentransplantaten geäußert [Robinson et al. 2002]. Deakin und Bannister empfahlen sogar den zusätzlichen Einsatz von autologem Knochenmark, um die Inkorporation des Knochentransplantats durch einen zusätzlichen Pool an knochenbildenden Zellen zu verbessern [Deakin und Bannister 2007]. Doch zeigte die Mehrzahl der klinischen Studien eine hervorragende Inkorporation von bestrahltem allogenen Spenderknochen. Beispielsweise wurde bei Acetabulum Revisionen die Therapie mit gefriegetrockneten, bestrahlten, allogenen Knochentransplantaten befürwortet [Vargas und Caton 2007].

In unsere Studie kam es zu einem maximalen Zelluntergang in den Kulturen mit 25kGy γ -bestrahlten Knochenprobenkörpern, mit signifikant schlechteren Zytokinprofil- und FACS-Ergebnissen im Vergleich zu den Ergebnissen der Kontrollkulturen und den mit 121°C autoklavierten Knochenprobenkörpern.

Unser Zellkulturmodell der humanen Knochenmarkszellkultur schien hier unter den gegebenen Umständen nicht in der Lage (vor allem mit der primär konstant ausgesäten Zellzahl) die Regenerationsfähigkeit des *in vivo* Transplantatlagers für γ -bestrahlte Knochentransplantate nachzubilden.

Grund hierfür könnte eine ungenügende Prozessierung bei der Entfettung der γ -bestrahlten Knochentransplantate gewesen sein.

Die Prozessierungsmethode zur Entfettung der Knochenprobenkörper wurde für alle Knochenprobenkörper beider Test-, sowie für die der Kontrollgruppen gleichermaßen durchgeführt. Jedoch fielen auf den γ -bestrahlten Knochentransplantaten rasterelektronmikroskopisch fettartige Auflagerungen auf.

Da diese fettartigen Tropfen nur in den γ -bestrahlten Knochentransplantaten nachweisbar waren, wurden sie vielleicht erst durch die Sterilisationsmethode freigesetzt. Die Arbeitsgruppe um Moreau beschrieb, dass zurückbleibende Lipide in den Spongiosaplättchen zu einer bräunlichen Farbveränderung nach der Strahlenexposition führen [Moreau et al. 2000]. Diese bräunliche Farbveränderung konnte bei verschiedenen der bestrahlten Spongiosaplättchen auch in dieser Studie beobachtet werden. Die Entfettung unserer Spongiosaplättchen unterschied sich im Vergleich zur Arbeitsgruppe um Moreau darin, dass die ersten Waschungen mittels Earle's Salt Solution (Biochrom AG, Berlin) versetzt mit 500IE Streptomycin/Penicillin, 4 μ g Amphotericin B und 10 μ g Gentamycin durchgeführt wurden. Weiterhin wurden die Spongiosaplättchen vor der eigentlichen Trocknung mit Pressluft bei 5 Bar ausgeblasen. Legt man die weiteren Erkenntnisse der Arbeitsgruppe Moreau zu Grunde, muss bei den γ -bestrahlten Knochenprobenkörpern davon ausgegangen werden, dass in unserem Versuchansatz noch zelltoxische Komponenten, zum Beispiel durch Radikalbildung und deren Freisetzung bei der Lipidperoxidation, in den verwendeten γ -bestrahlten Knochenprobenkörpern vorhanden waren [Moreau et al. 2000].

Die zelluläre Reaktion der humanen Knochenmarkszellkultur auf den 121°C autoklavierten Knochen widerlegte die Daten von Schratt et al., der von einem völligen Antigenverlust bei autoklaviertem Knochen ausging [Schratt et al. 1997]. Es kam zu einer signifikanten Zytokinausschüttung an Il-6, sowie Verschiebungen in den Zellsubpopulationen (Vermehrung von reifen T-Zellen, $p < 0,001$). Der 121°C autoklavierte allogene Transplantatknochen zeichnete sich auf Zytokin- und Zellebene durch Ergebnisse aus, die eine Integration des Spenderknochens erleichtern könnten. Von einer Zelltoxizität des Verfahrens auf die Zellkulturen ist nicht auszugehen.

In der aktuellen Literatur liegen für den autoklavierten Knochen jedoch gegensätzliche Ergebnisse vor. Allgemein geht man von einem völligen Verlust der osteoinduktiven Fähigkeiten des autoklavierten Transplantatknochens aus. Hier sei an die Denaturierung

von osteinduktiven Proteinen, wie z.B. des BMP, erinnert [Ohta et al. 2005]. In einem MTT-Assay von humanen Zellen die ebenfalls auf verschiedenen sterilisierten allogenen Knochenproben ausgesät wurden, zeigten die autoklavierten Kulturen die signifikant niedrigste metabolische Aktivität in den ersten Tagen des Versuchansatzes [Hofmann et al. 2005]. Jedoch verwendete Hofmann et al. in diesem Versuchansatz eine Osteoblastenzellkultur, welche die Situation am Transplantatlager nur bedingt widerspiegeln kann.

Zoricic et al. berichteten in einer Tiermodellstudie über fehlende oder verzögerte Einheilungsprozesse von autoklaviertem Knochen. Als Versuchstiere wurden Hasen (männlich, 3-4kg, mit einem standardisierten Knochendefekt an der Ulna) mit verschiedenen allogenen Knochentransplantaten von Spendertieren versorgt. Im Verlauf zeigte sich hier der autoklavierte, allogene Knochen unterlegen. Histomorphologische Parameter wie z.B. Knochenneubildung, Dicke des Osteoids oder die Resorbierung und Inkooperation des Transplantatknochens waren signifikant schlechter gegenüber denen anderer getesteter Verfahren (hier autoklavierter, gefrorener und pasteurisierter allogener Knochen von Spendertieren) [Zoricic et al. 2002]. Jedoch sind bekanntlich diese im Tierexperiment gewonnen Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die *in vivo* Situation oder die *in vitro* Situation in einem Zellkultursystem zu übertragen.

Verschiedene Autoren berichteten in Fallstudien über ihre Ergebnisse mit autoklaviertem Knochen. Beispielweise zeigten Yamamoto et al. in einer histologischen Beurteilung von transplantiertem, autoklaviertem, allogenen Knochen lediglich eine überbrückende Knochenbildung durch den Wirt. Eine wirkliche Durch- und Umbauung fand in diesem Fall auch nach Jahren nicht statt [Yamamoto et al. 2003]. Hayashi et al. sehen das autoklavierte Knochentransplantat sogar als unakzeptable Lösung in der Behandlung eines Knochendefektes [Hayashi et al. 2005]. In diesen beiden Arbeiten handelt es sich jedoch um Fallstudien, d.h. verschiedenste Faktoren könnten für das schlechte Ergebnis des autoklavierten Transplantatknochens ursächlich gewesen sein. Faktoren, wie die Größe des Knochentransplantats, die in beiden Fällen stattgefundene Chemotherapie der Patienten (es handelte sich hier um Patienten mit einem Tumorleiden) und die Beschaffenheit des umgebenen Gewebes wurden in diesen Fallstudien nicht berücksichtigt.

Zusammenfassend ist es notwendig nicht nur die biomechanischen, osteoinduktiven und osteokondutiven Eigenschaften von allogenen Knochentransplantaten in die Beurteilung von Prozessierungsverfahren einfließen zu lassen.

Die Immunantwort des Empfängerorganismus ist ebenso mitentscheidend für das Remodelling und die Osseointegration des allogenen Transplantatknochens im Empfängerorganismus. Demnach sollte das verwendete Knochensterilisationsverfahren die Immunreaktion des Wirts ähnlich der Implantation von autologem Knochen modulieren, um hierdurch möglichst ähnliche osteointegrative Mechanismen und Abläufe zu triggern und ein optimales Einheilen zu ermöglichen.

Diese Arbeit gibt mit Hilfe der humanen Knochenmarkszellkultur Hinweise auf die *in vivo* Situation im Transplantatlager des Empfängers.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Immunmodulation der Zellkultur durch das jeweilige Knochensterilisationsverfahren induziert werden kann.

Der direkte Vergleich der beiden Knochensterilisationsverfahren gelang nur bedingt, da die humanen Knochenmarkszellkulturen in dieser Studie ihre Grenzen in der zellulären Regenerationfähigkeit zeigten. Die humane Knochenmarkszellkultur ist ein etabliertes Screeningverfahren, um neue Biomaterialien vor der Anwendung am Menschen zu testen. Jedoch scheint die Kultur unter den jetzigen Bedingungen nicht in Lage die Regenerationsfähigkeit des *in vivo* Transplantatlagers, nachzuahmen. Eine Testung von Biomaterialien im Tierversuch wird vor der Testung *in situ* weiterhin unvermeidbar bleiben. Jedoch könnten diese durch Vortestung des Biomaterials in humanen Knochenmarkszellkulturen verringert werden.

Verbessernd ist über einen fortlaufenden Mediumflow in den Kulturen nachzudenken, um den Verhältnissen *in situ* besser gerecht zu werden. Das derzeitige Mediumwechselintervall (alle 48 Stunden) scheint nicht ausreichend (siehe Lactat, LDH und pH-Werte). Durch einen fortlaufenden Mediumflow in den Kulturen sollte sich der Zellanteil im abgesaugten Medium nach Mediumwechsel verringern lassen und die Anzahl vitaler Zellen in den Kulturen konstanter bleiben. Auch sollten die behandelten allogenen Knochenproben in den Kulturschalen mechanisch stabilisiert werden. Scherbewegungen am Wellboden oder ein Aufschwimmen der Spongiascheiben könnten so verhindert werden. Über eine Veränderung des Versuchsaufbaus, der dann eine mechanische Belastung der Knochenproben und Kulturen möglich machen könnte, sollte ebenfalls nachgedacht werden.

Diese Optimierungen könnten das Versuchsdesign noch besser die *in vivo* Situation am Transplantatlager widerspiegeln lassen.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie untersuchte den Einfluss von unterschiedlich sterilisierten allogenen Knochentransplantaten auf die Zytokinfreisetzung und Differenzierung von humanem Knochenmarkzellkulturen. Die in dieser Studie getesteten Knochensterilisationsverfahren waren die 121°C Autoklavierung und die 25 kGy γ -Bestrahlung, welche beide im klinischen Alltag in der orthopädisch- und traumatologischen Chirurgie eingesetzt werden.

Das von uns gewählte Studiendesign sollte im Zeitraum von 12 Wochen die Zytokinfreisetzung und Differenzierung anhand eines Zellkultursystems belegen. Um Fehlerquellen anderer Zellkultursysteme und Tierversuche zu umgehen, wurde als Primärkultur die humane Knochenmarkszellkultur gewählt. Diese Zellkultur ist in der Lage, die *in situ* Situation am Transplantatlager bedingt nachzubilden.

Ziel war Rückschlüsse auf die Biokompatibilität der behandelten allogenen Knochentransplantate ziehen zu können. Als Messparameter wurde die Ausschüttung der Zytokine IL-1 β , IL-6, INF- γ und TNF- α bestimmt, sowie eine FACS-Untersuchung mit CD-Antikörpern durchgeführt. Außerdem wurden Messungen von LDH, Lactat und alkalische Phosphatase durchgeführt und durch Zellzahl- und pH-Wert Bestimmungen ergänzt. Zusätzlich erfolgten lichtmikroskopische Kontrollen und die Anfertigung rasterelektronenmikroskopischer Bilder.

Es gelang in diesem Studiendesign Daten über das Zytokinprofil und die Zelldifferenzierung der humanen Knochenmarkszellkulturen auf den behandelten allogenen Knochentransplantaten zu erheben, welche wiederum hinweisend auf die *in vivo* Situation im Transplantatlager des Empfängers sein könnten.

Zusammenfassend löste der 121° autoklavierte allogene Knochen in unserem Studiendesign ein physiologischeres Ergebnis als der 25kGy γ -bestrahlte allogene Knochen in den humanen Knochenmarkszellkulturen aus.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1 a) Diamanthohlbohrer b) Ausbohren der Spongiosazyylinder	29
Abbildung 3-2 Die Gamma-Anlage – Darstellung des Produktweges.....	32
Abbildung 3-3 Dosisverteilung	33
Abbildung 3-4 Zerkleinerung der Spongiosa mittels Schnabelzange.....	35
Abbildung 3-5 Darstellung der Interphase im Dichtegradienten nach Zentrifugation der Zellsuspension humaner Knochenmarkszellen.....	36
Abbildung 3-6 Darstellung einer humanen Knochenmarkspreparation mittels Zellzähler als CASY-Graph	37
Abbildung 3-7 Darstellung des Versuchdesigns des 12 Wochenversuchs	39
Abbildung 3-8 Darstellung des Versuchdesigns des 4-Wochenversuchs/ FACS-Versuchs.....	41
Abbildung 3-9 Auflichtmikroskopische Aufnahme einer humanen Knochenmarkszellkultur mit Knochenbruchstück „autoklaviert 121°C“, Tag 18 nach Aussaat, Vergrößerung 100x	46
Abbildung 3-10 Beispiel: Graphik Casyzählung.....	47
Abbildung 3-11 Eingebettete Knochenproben	62
Abbildung 3-12 Hartstahlmikrotom.....	63
Abbildung 4-1 Auflichtmikroskopische Aufnahme einer humanen Knochenmarkszellkultur Tag 0 nach Aussaat – Vergrößerung 100x – Kontrolle ohne Probenkörper	80
Abbildung 4-2 Auflichtmikroskopische Aufnahme einer humanen Knochenmarkszellkultur Tag 14 nach Aussaat – Vergrößerung 100x – Kontrolle ohne Probenkörper	80
Abbildung 4-3 Auflichtmikroskopische Aufnahme einer humanen Knochenmarkszellkultur Tag 21 nach Aussaat – Vergrößerung 100x – Kontrolle ohne Probenkörper	81
Abbildung 4-4 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkontrollkultur Tag 6 nach Aussaat	82
Abbildung 4-5 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkontrollkultur, Tag 20 nach Aussaat	83
Abbildung 4-6 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkontrollkultur, Tag 66 nach Aussaat	83
Abbildung 4-7 IL-6 Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen.....	84
Abbildung 4-8 IFN – γ Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen.....	86
Abbildung 4-9 . IL - 1β Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen.....	87
Abbildung 4-10 . TNF – α Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen	88
Abbildung 4-11 Lactat Werte der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen.....	89
Abbildung 4-12 . LDH Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen.....	91
Abbildung 4-13 Freisetzung der alkalischen Phosphatase der humanen Knochenmarkszellkontrollkulturen.....	92
Abbildung 4-14 Darstellung der FACS-Analysen an Tag 0 und Tag 28 nach Aussaat	94
Abbildung 4-15 Auflichtmikroskopische Aufnahme einer humanen Knochenmarkszellkultur mit Knochenproben „autoklaviert 121°C“ Tag 7 nach Aussaat – Vergrößerung 100x	96

Abbildung 4-16 Auflichtmikroskopische Aufnahme einer humanen Knochenmarkszellkultur mit Knochenproben „autoklaviert 121°C“ Tag 21 nach Aussaat – Vergrößerung 100x.....	97
Abbildung 4-17 Auflichtmikroskopische Aufnahme einer humanen Knochenmarkszellkultur mit Knochenproben „ γ -bestrahlte 25kGy“ Tag 14 nach Aussaat – Vergrößerung 100x.....	98
Abbildung 4-18 Zellzahlbestimmungen aus den abgesaugten Mediumüberständen der Kulturen	99
Abbildung 4-19 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkultur auf 121°C autoklavierten Knochenproben, Tag 6 nach Aussaat	101
Abbildung 4-20 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkultur auf 121°C autoklavierten Knochenproben, Tag 20 nach Aussaat	101
Abbildung 4-21 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkultur auf 121°C autoklavierten Knochenproben, Tag 44 nach Aussaat	102
Abbildung 4-22 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkultur auf 25kGy γ -bestrahlten Knochenproben, Tag 6 nach Aussaat	103
Abbildung 4-23 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkultur auf 25kGy γ -bestrahlten Knochenproben, Tag 20 nach Aussaat	103
Abbildung 4-24 Größenverteilung der abgesaugten Bestandteile aus dem Medium einer humanen Knochenmarkszellkultur auf 25kGy γ -bestrahlten Knochenproben, Tag 44 nach Aussaat	104
Abbildung 4-25 Mittelwertberechnung $x=4$ der Trypanblauauswertung der Kulturen, Tag 28 nach Aussaat.....	105
Abbildung 4-26 Spongiosascheibe „autoklaviert 121°C“ mit vitalen Zellen, 28 Tage nach Aussaat, auflichtmikroskopisch, Vergrößerung 100x, Direktfärbung Trypanblau.....	106
Abbildung 4-27 Spongiosascheiben „autoklaviert 121°C“ mit Zellbrücke vitaler Zellen, 28 Tage nach Aussaat, auflichtmikroskopisch, Vergrößerung 100x, Direktfärbung Trypanblau.....	107
Abbildung 4-28 Spongiosascheibe „ γ -bestrahlt 25kGy“, 28 Tage nach Aussaat, auflichtmikroskopisch Vergrößerung 100x, Direktfärbung Trypanblau.....	108
Abbildung 4-29 Darstellung der FACS-Analysender Kulturen an Tag 28 nach Aussaat.....	109
Abbildung 4-30 IL-6 Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen	111
Abbildung 4-31 Tabelle IL-6 Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen.....	112
Abbildung 4-32 IL-6 Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen ab 18. Mediumwechsel.....	113
Abbildung 4-33 Tabelle IL-6 Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen ab 18. Mediumwechsel	114
Abbildung 4-34 IL-1 β Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen.....	116
Abbildung 4-35 Tabelle IL-1 β Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen.....	117
Abbildung 4-36 IFN- γ Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen.....	118
Abbildung 4-37 Tabelle IFN- γ Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen	119
Abbildung 4-38 TNF – α Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen.....	120
Abbildung 4-39 Tabelle TNF – α Freisetzung der humanen Knochenmarkszellkulturen.....	121
Abbildung 4-40 Lactat Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen	122
Abbildung 4-41 Tabelle Lactat Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen	123
Abbildung 4-42 Lactat Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen ab 18. Mediumwechsel.....	124
Abbildung 4-43 Tabelle Lactat Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen ab 18. Mediumwechsel.....	125

Abbildung 4-44 LDH Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen.....	127
Abbildung 4-45 Tabelle LDH Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen.....	128
Abbildung 4-46 LDH Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen ab 18. Mediumwechsel.....	129
Abbildung 4-47 Tabelle LDH Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen ab 18. Mediumwechsel.....	130
Abbildung 4-48 AP Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen.....	132
Abbildung 4-49 Tabelle AP Werte der humanen Knochenmarkszellkulturen.....	133
Abbildung 4-50 pH-Werte der verschiedenen humanen Zellkulturen im Kulturverlauf.....	134
Abbildung 4-51 humane Knochenmarkszellen einer der Kontrollkulturen, 84 Tage nach Aussaat, Giemsa-Färbung, Vergrößerung 100x, Auflichtmikroskopie.....	135
Abbildung 4-52 humane Knochenmarkszellen der Kontrollkulturen, 84 Tage nach Aussaat, Giemsa-Färbung, Vergrößerung 200x, Auflichtmikroskopie.....	136
Abbildung 4-53 humane Knochenmarkszellen kultiviert auf 121°C autoklavierten Knochenproben, 84 Tage nach Aussaat, Giemsa-Färbung, Vergrößerung 200x, Auflichtmikroskopie.....	136
Abbildung 4-54 121°C autoklavierte Knochenprobe mit humanen Knochenmarkszellen, 84 Tage nach Aussaat, Giemsa-Färbung, Vergrößerung 200x, Auflichtmikroskopie.....	137
Abbildung 4-55 25kGy γ -bestrahlte Knochenprobe mit humanen Knochenmarkszellen, 84 Tage nach Aussaat, Giemsa-Färbung, Vergrößerung 200x, Auflichtmikroskopie.....	137
Abbildung 4-56 Dünnschnitt in Durchlichttechnik einer Knochenprobe „autoklaviert 121°C“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 50x, von-Kossa-Färbung.....	139
Abbildung 4-57 Dünnschnitt in Durchlichttechnik einer Knochenprobe „ γ -bestrahlt 25kGy“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 50x, von-Kossa-Färbung.....	140
Abbildung 4-58 Dünnschnitt in Durchlichttechnik einer Knochenprobe „autoklaviert 121°C“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 100x, Giemsa-Färbung.....	141
Abbildung 4-59 Dünnschnitt in Durchlichttechnik einer Knochenprobe „ γ -bestrahlt 25kGy“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 100x, Giemsa-Färbung.....	141
Abbildung 4-60 Dünnschnitt in Durchlichttechnik einer Knochenprobe „autoklaviert 121°C“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 100x, H&E-Färbung.....	142
Abbildung 4-61 Dünnschnitt in Durchlichttechnik einer Knochenprobe „ γ -bestrahlt 25kGy“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 100x, H&E-Färbung.....	142
Abbildung 4-62 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Kontrollkultur humaner Knochenmarkszellen, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 200x.....	143
Abbildung 4-63 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Kontrollkultur humaner Knochenmarkszellen, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 450x.....	144
Abbildung 4-64 Rasterelektronmikroskopische Aufnahme einer Knochenprobe „autoklaviert 121°C“ mit humanen Knochenmarkszellen, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 70x.....	145
Abbildung 4-65 Kultur Rasterelektronmikroskopische Aufnahme einer Knochenprobe „autoklaviert 121°C“ mit humanen Knochenmarkszellen, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 200x.....	146
Abbildung 4-66 Rasterelektronmikroskopische Aufnahme einer Knochenprobe „ γ -bestrahlt 25kGy“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 100x.....	147
Abbildung 4-67 Rasterelektronmikroskopische Aufnahme einer Knochenprobe „ γ -bestrahlt 25kGy“, Tag 84 nach Aussaat, Vergrößerung 100x.....	148

Abbildung 14-1 Zertifikat der Firma Beta-Gamma-Service GmbH & Co. KG 189

8 Literaturverzeichnis

- Albrektsson T, Johansson C (2001)
Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.
Eur Spine J 2:96-101
- Allen TD (1981)
Haemopoietic microenvironments in vitro: ultrastructural aspects.
Microinviroments in haemopoetic and lymphoid differentiation. Pitman Medical,
London. Ciba Foundation symposium 84:38-67
- Anderson MJ, Keyak JH, Skinner HB (1992)
Compressive mechanical properties of human cancellous bone after gamma irradiation.
J Bone Joint Surg Am 74:1274
- Akkus O, Belaney RM (2005)
Das P. Free radical scavenging alleviates the biomechanical impairment of gamma
radiation sterilized bone tissue.
J Orthop Res 23:838-45
- Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK (1995)
Osteoblast and chondroblast differentiation.
Bone 17:77-83
- Begemann H, Rastetter J (1993)
Klinische Hämatologie.
Georg Thieme Verlag
- Bellido T, Jilka RL, Boyce BG, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R,
Manolagas SC (1995)
Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis and bone mass by androgens. The role
of the androgen receptor.
J Clin Invest 6:2886-95
- Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR (1986)
Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human
tumor necrosis factors.
Nature 319:516-518
- Black J (1992)
Biological Performance of Materials.
New York, M. Dekker
- Black J (1988)
Orthopedic Biomaterials in Research and Practice.
New York: Churchill Livingstone etc. 133-158
- Black J, Oppenheimer P, Morris DM, Peduto AM, Clark CC (1987)

Release of corrosion products by F-75 cobalt base alloy in the rat. III: Effects of a carbon surface coating.

J Biomed Mater Res 21:1213-1230

Boyce T, Edwards J, Scarborough N (1999)

Allograft bone. The influence of processing on safety and performance.

Orthop Clin North Am 30:571-581

Bright RW (1987)

Sterilisation of human bone by irradiation.

In: Friedländer GE et al (eds) Osteochondral allografts, Biology, Banking and clinical applications.

Boston, Toronto, Little Brown, 223-232

Buchinsky FJ, Ma Y, Mann GN, Rucinski B, Bryer HP, Romero DF, Jee WS, Epstein S (1996)

T lymphocytes play a critical role in the development of cyclosporin A-induced osteopenia.

Endocrinology 137(6):2278-2285

Bundesärztekammer - Wissenschaftlicher Beirat (2001)

Richtlinien zum Führen einer Knochen-bank.

Deutsches Ärzteblatt 98(15):1011-1016

Burchart, H. (1996)

Current Concepts in Bone Grafting.

In: Orthopaedic Allograft Surgery, 3-10

Springer Wien, New York

Canalis E (1986)

Interleukin-1 has independent effects on desoxyribonucleic acid and collagen synthesis in cultures of rat calvariae.

Endocrinology 118(1):74-81

Carrel A (1912)

The preservation of tissues and its application in surgery.

JAMA 59:523-527

Center for Disease Control and Prevention (2002)

Update: Allograft Associated Bacterial Infections.

MMWR 51(10):207-210

Centers for Disease Control (1988)

Pneumocystis pneumonia – Los Angeles.

MMWR 30:250-252

Centers for Disease Control (1988)

Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations.

MMWR 37:595-599

- Charbord P, Fujiwara M, Singer JW (1986)
Long-term cultures of human marrow cells.
Nouv Rev Fr Hematol 28(2):65-74.
- Cho TJ, Kim JA, Chung CY, Yoo WJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Choi IH (2007)
Expression and role of interleukin-6 in distraction osteogenesis.
Calcif Tissue Int 80(3):192-200
- Ciapetti G, Ambrosio L, Marletta G, Baldini N, Giunti A (2006)
Human bone marrow stromal cells: In vitro expansion and differentiation for bone engineering.
Biomaterials 27(36):6150-6160
- Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR *et al.* (1995)
Transmission of the hepatitis C virus by tissue transplantation.
J Bone Joint Surg 77A:214–224
- Currey JD, Foreman J, Laketić I, Mitchell J, Pegg DE, Reilly GC (1997)
Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone.
J Orthop Res 15(1):111-117
- Deakin DE, Bannister GC (2007)
Graft incorporation after acetabular and femoral impaction grafting with washed irradiated allograft and autologous marrow.
J Arthroplasty 22(1):89-94
- De Boer H (1989)
Early research on bone transplantation.
In: Bone Transplantation. Eds.: Aebi M, Regazzoni P
Springer, Berlin
- Dexter TM, Allen TD, Lajtha LA (1976)
Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro.
J Cell Physiol 335-344
- Dexter TM, Spooner E, Simmons P, Allen TD (1984)
Long-term marrow culture: An overview of techniques and experience.
In: Long-term bone marrow culture Eds.: Alan R
Liss Inc 57-96
- Dinarello CA (1993)
Blocking interleukin-1 in disease.
Blood Purif 11(2):118-27
- Dinarello CA (1991)
Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism.
Blood 77:1627-1652
- Dinarello CA (1995)
Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist.

Nutrition 11(5) 492-494

Dinareello CA (1993)
Modalities for reducing interleukin-1 activity in disease.
Trends Pharmacol Sci 14(5):155-159

Eggen BM, Nordbo SA (1992)
Transmission of HCV by organ transplantation (letter).
N Eng J Med 326-411

European Association of Musculoskeletal Transplantation (EAMST),
European Association of Tissue Banks (EATB) (1997)
Common standards for musculo skeletal tissue banking.
OBIG-Transplant, Vienna

Endres S, Efe T, Schickl G, Wilke A (2003)
Analyse einer humanen Knochenmark-Langzeitzellkultur - Teil I und Teil II.
Osteologie 3:175-197

Endres S, Landgraff M, Kratz M, Wilke A (2004)
Biocompatibility testing of various biomaterials as dependent on immune status.
Z Orthop Ihre Grenzgeb 142(3):358-65

Endres S, Kratz M, Heinz M, Herzberger C, Reichel S, von Garrel T, Gotzen L,
Wilke A (2005)
Biocompatibility testing of different sterilised or disinfected allogeneous bone grafts in
comparison to the gold standard of autologous bone grafts--an "in vitro" analysis of
immunomodulation.
Z Orthop Ihre Grenzgeb 143(6):660-668

Galea G, Kearney JN (2005)
Clinical effectiveness of processed and unprocessed bone.
Transfus Med 15(3):165-174

Gesellschaft für Zentralsterilisation von Medizinprodukten (2005)
EN 285 - Dampf-Grossterilisatoren
www.gzm.de

Godette GA, Kopta JA, Egle DM (1996)
Biomechanical effects of gamma irradiation on fresh frozen allografts in vivo.
Orthopedics 19(8):649-653

Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier SN (2001)
Bone graft substitutes: facts, fictions, and clinical application.
JBJS 83A:98-103

Hara Y, Ukai T, Yoshimura A, Shiku H, Kato I (1998)
Histopathological study of the role of CD4- and CD8-positive T cells on bone
resorption induced by Escherichia coli endotoxin.
Calcif Tissue Int 63(1):63-66

Hayashi K, Tsuchiya H, Yamamoto N, Minato H, Tomita K (2005)
Histological examination of autoclaved bone removed 12 years after it was transplanted.
J Orthop Sci 10(4):425-429

Hofmann C, Garrel Tv, Gotzen L (1996)
Knochenbankmanagement bei Verwendung eines thermischen Desinfektionssystems
(Lobator SD-1).
Unfallchirurg 99:498-508

Hofmann A, Konrad L, Hessmann MH, Kühle R, Korner J, Rompe JD,
Rommens PM (2005)
The influence of bone allograft processing on osteoblast attachment and function.
J Orthop Res 23(4):846-54

Hofmann A, Hofmann C, Gotzen L (2000)
Effect of various bone disinfection and sterilization methods on osteoblast function. A
comparative in vitro study.
Unfallchirurg 103(5):380-388

Horowitz MC, Coleman DL, Flood PM, Kuppler TS, Jilka RL (1989)
Parathyroid hormone and Lipopolysaccharide induce murine osteoblast-like cells to
secrete a cytokine indistinguishable from granulocyte-macrophage colony-stimulating
factor.
J Clin Invest 83:149-157

Horowitz MC, Coleman DL, Ryaby JT, Einhorn TA (1989)
Osteotropic agents induce the differential secretion of granulocyte-macrophage colony
stimulating factor by the osteoblast cell line MC3T3-E1.
J Bone Miner Res 6:911-921

Horowitz MC, Philbrick WM, Jilka RL (1989)
Il-1 release from cultured calvaria cells is due to macrophages.
J Bone Miner Res 4:556

Hyatt GW (1950)
Fundamentals in the use and preservation of homogenous bone.
US Armed Forces Medical J 1:841-852

IAEA (2002)
International standards on tissue banking – first meeting of the IAEA technical advisory
committee.
In: The IAEA programme in radiation and tissue banking.
IAEA, Boston 44

IAEA (2002)
Specific processing procedures.
In: The IAEA programme in radiation and tissue banking.
IAEA, Boston 26-29

Ibelgauft (2003)

Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia.
www.copewithcytokines.de

James JIP (1953)
Tuberculosis transmitted by banked bone.
J Bone Joint Surg 35B:578-580

Jäger M, Wilke A (2003)
Comprehensive biocompatibility testing of a new PMMA-hA bone cement versus
conventional PMMA cement in vitro.
J Biomater Sci Polym Ed 14(11):1283-98

Jerosch J, Castro WH, Granrath M, Rosin H (1990)
Knochenbanken in der BRD: Ergebnisse einer Befragung.
Unfallchirurg 93:334-338

Jimi E, Shuto T, Koga T (1995)
Macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 alpha maintain the survival of
osteoclast-like cells.
Endocrinology 136(2):808-811

Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B,
Broxmeyer H, Manolagas SC (1992)
Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6.
Science 257(5066):88-91

Johnson HJ, Northup SJ, Seagraves PA, Garvin P, Wallin R (1983)
Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro 1. Comparative test
system sensitivity.
J Biomed Mater Res 17:571-586

Johnson RA, Boyce BF, Mundy GR, Roodman GD (1989)
Tumors producing human tumor necrosis factor induce hypercalcemia and osteoclastic
bone resorption in mice.
Endocrinology 124:1424-1427

Kalla P, Hintz-Obertreis P, Wilke A, Griss P, Seiler FR, Rude E, Krumwieg D (1991)
Bone marrow obtained during hip surgery : a novel source for studies of hemopoiesis in
human long-term bone marrow culture (LTBMC).
Behring Inst Mitt 90:93-98

Kalla P, Oster W, Seiler F, Rude E, Krumwieg D (1992)
Myelosuppressive effects of cytosine arabinoside (Ara-C) on growth factor dependent
human long-term bone marrow cultures (LTBMC).
J Cell Clon 10:54-62

Kennedy JF, Phillips GO, Williams PA (2005)
Sterilisation of tissues using ionising radiation.
CRC Press LLC, Boca Raton, FL

Kim N, Kadono Y, Takami M, Lee J, Lee SH, Okada F, Kim JH, Kobayashi T, Odgren PR, Nakano H, Yeh WC, Lee SK, Lorenzo JA, Choi Y (2005)
Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis.
J Exp Med 202(5):589-95

Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ, Suda T (2000)
Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction.
J Exp Med 191(2):275-86

Knaepler H, Garrel Tv, Gotzen L (1994)
Untersuchungen zur Desinfektion und Sterilisation allogener Knochentransplantate.
Berlin, Heidelberg: Springer

Knaepler H, Haas H, Puschel HU (1991)
Biomechanical properties of heat and irradiation treated spongiosa.
Unfallchirurgie 17(4):194-199

Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2001)
Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing.
J Bone Miner Res 16(6):1004-1014

Kuner EH, Schlickewei W, Huber-Lang M, Schaefer DJ, Laubender J (1998)
Using autoclaved spongiosa
Unfallchirurg 101(11):870-876

Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD (1990)
IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release.
J Immunol 144(11):4226-4230

Kurihara N, Chenu C, Miller M, Civin C, Roodman GD (1990)
Identification of committed mononuclear precursors for osteoclast-like cells formed in long term human marrow cultures.
Endocrinology 126(5):2733-2741

Kyoto Universität (1991)
Mechanische Festigkeit des erhitzten Knochens.

Kyoto Universität (2001)
Die Geschwindigkeit der Knocheneinheilung in Abhängigkeit von der Temperatur des erhitzten Knochentransplantates.

Lexer E (1908)
Die Verwendung der freien Knochenplastik nebst Versuchen über Gelenkversteifung und Gelenktransplantation.

Archiv für klinische Chirurgie 68:940–948

Lexer E (1925)

Joint transplantation and arthroplasty.

Surg Gynec Obstet 40:782–788

Lloyd-Robert GC (1952)

Experiences with boild cadaveric bone.

J Bone Joint Surg 34B:428

MacEwen W (1881)

Observations concerning transplantation of bone: illustrated by a case of inter-human osseous transplantation, whereby over two-thirds of the shaft of a humerus was restored.

Proc Royal Soc 32:232–247

Moreau MF, Gallois Y, Basle MF, Chappard D (2000)

Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells.

Biomaterials 21(4):369-376

Ohsaki Y, Takahashi S, Scarcez T, Demulder A, Nishihara T, Williams R, Roodman GD (1992)

Evidence for an autocrine/paracrine role for interleukin-6 in bone resorption by giant cells from giant cell tumors of bone.

Endocrinology 131(5):2229-2234

Ohta H, Wakitani S, Tensho K, Horiuchi H, Wakabayashi S, Saito N, Nakamura Y, Nozaki K, Imai Y, Takaoka K (2005)

The effects of heat on the biological activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2.

J Bone Miner Metab 23(6):420-425

Raisz LG (1999)

Physiology and pathophysiology of bone remodeling.

Clin Chem 45:1353-1358

Rifas L, Arackal S, Weitzmann MN (2003)

Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts.

J Cell Biochem 88(4):650-659

Reddi AH (1998)

Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration.

Nature Biotechnoln 16:247-252

Robinson DE, Lee MB, Smith EJ, Learmonth ID (2002)

Femoral impaction grafting in revision hip arthroplasty with irradiated bone.

J Arthroplasty 17(7):834-840

Roodman GD (2006)

Regulation of osteoclast differentiation.

Ann N Y Acad Sci 1068:100-109

Rozen N, Ish-Shalom S, Rachmiel A, Stein H, Lewinson D (2000)
Interleukin-6 modulates trabecular and endochondral bone turnover in the nude mouse
by stimulating osteoclast differentiation.
Bone 26(5):469-474

Rozen N, Lewinson D, Bick T, Jacob ZC, Stein H, Soudry M (2007)
Fracture repair: modulation of fracture-callus and mechanical properties by sequential
application of IL-6 following PTH 1-34 or PTH 28-48.
Bone 41(3):437-445

Sasaki H, Balto K, Kawashima N, Eastcott J, Hoshino K, Akira S, Stashenko P (2004)
Gamma interferon (IFN-gamma) and IFN-gamma-inducing cytokines interleukin-12
(IL-12) and IL-18 do not augment infection-stimulated bone resorption in vivo.
Clin Diagn Lab Immunol 11(1):106-110

Sasaki H, Hou L, Belani A, Wang CY, Uchiyama T, Müller R, Stashenko P (2000)
IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo.
J Immunol 165(7):3626-3630

Schratt HE, Regel G, Kiesewetter B, Tscherne H (1996)
HIV-Infektion durch kältekonservierte Knochentransplantate.
Unfallchirurg 99(9):679-84

Schratt HE, Spyra JL (1997)
Experimental studies of healing and antigenicity of sterilized bone transplants.
Chirurg 68(1):77-83

Sharrock WJ (1998)
Bone and the hematopoietic and immune systems: a report of the proceedings of a
scientific workshop.
J Bone Miner Res 13(4):537-543

Shin S, Yano H, Fukunaga T, Ikebe S, Shimizu K, Kaku N, Nagatomi H,
Masumi S (2005)
Biomechanical properties of heat-treated bone grafts.
Arch Orthop Trauma Surg 125(1):1-5

Shutkin NM (1954)
Homologous-serum hepatitis following the use of refrigerated bone-bank bone. Report
of a case.
J Bone Joint Surg 36A:160-162

Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F,
Mantovani A, Shanebeck K, et al. (1993)
Interleukin-1 signaling occurs exclusively via the type I-receptor.
Proc Natl Acad Sci USA 90:6155-6159

Speziani C, Rivollier A, Gallois A, Coury F, Mazzorana M, Azocar O, Flacher M, Bella
C, Tebib J, Jurdic P, Rabourdin-Combe C, Delprat C (2007)

Murine dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts is differentially regulated by innate and adaptive cytokines.

Eur J Immunol 37(3):747-757

Stenberg F, Wilke A (2001)

Evaluation of bioresorbable polymers of lactic acid in a culture of human bone marrow cells.

J Biomater Sci Polym Ed 12(2):171-84

Stürz, S. (2003)

Zytokinprofil einer humanen Knochenmarkszellkultur nach Exposition mit Chrom – Kobalt – Abriebpartikeln.

Medizinisches Zentrum für Operative Medizin II der Philipps – Universität Marburg

Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N (1995)

Modulation of osteoclast differentiation by local factors.

Bone 17:87-91

Takayanagi H (2005)

Inflammatory bone destruction and osteoimmunology.

J Periodontal Res 40(4):287-293

Teitelbaum SL (2004)

Postmenopausal osteoporosis, T cells, and immune dysfunction.

Proc Natl Acad Sci USA 101(48):16711-16712

Ukai T, Hara Y, Kato I (1996)

Effects of T cell adoptive transfer into nude mice on alveolar bone resorption induced by endotoxin.

J Periodontal Res 31(6):414-422

Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM (1967)

The bone induction principle.

Clin Orthop Relat Res 53:243-283

Väänänen K (1996)

Osteoclast function: biology and mechanism.

In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, Principles of Bone Biology.

Acad Press NY 103-113

Vaes G (1988)

Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts.

Clin Orthop 231:239-271

Vangsness C Jr, Triffon M, Joyce M, Moore T (1996)

Soft tissue for allograft reconstruction of the human knee: a survey of the American Association of Tissue Banks.

Am J sports Med 24:230-234

Vargas B, Caton J (2007)

Acetabular revision with freeze-dried irradiated and chemically treated allograft: a minimum 5-year follow-up of 17 cases.
Int Orthop Epub

Voggenreiter G, Ascherl R, Blumel G, Schmit Neuerburg KP (1994)
Effects of Preservation and Sterilization on Cortical Bone Grafts, A Scanning Electron Microscopic Study.
Arch Orthop Trauma Surg 113:294–296

von Garrel T, Gotzen L (1998)
Allogene Knochentransplantation und Knochenbanking.
Unfallchirurg 101:713-727

von Garrel T (2003)
Persönliche Mitteilung auf der Grundlage einer Befragung von 1.400 chirurgischen/orthopädischen Kliniken in Deutschland aus dem Jahr 2001.

von Versen R, Heider H, Kleemann I, Starke R (1992)
Chemische Sterilisation biologischer Implantate mit einer Kombinationsmethode.
In: Pesch HJ, Stöß H, Kummer B, Osteologie aktuell.
Springer 7:380–386

Wagner M, Pesch HJ (1989)
Autoklavierte Knochenspäne beim Prothesenwechsel an der Hüfte.
Orthopäde 18:463-467

Wilke A, Bartsch I, Kratz M, Jones D, Endres S (2005)
Cytokine profile of a human bone marrow cell culture under the influence of UHMW-PE wear particles.
Biomed Tech (Berl) 50(10):330-336

Wilke A, Endres S, Griss P, Herz U (2002)
Cytokine profile of a human bone marrow cell culture on exposure to titanium – aluminium – vanadium particles.
Z Orthop Ihre Grenzgeb 140:83–89

Wilke A, Ahmed M, Nagel R, Kienapfel H, Orth J, Griss P, Franke RP (1995)
Cell-differentiation of human bone marrow cells depending on applied biomaterials.
In: Vincenzini P, Materials in Clinical Applications, Advances in Science and Technology 12:343–348

Wilke A, Landgraff M, Orth J, Poenitz H, Kienapfels H, Boelte K, Griss P, Franke RP (1999)
Human bone marrow cell culture - A sensitive method for determination of the biocompatibility of implant materials.
ATLA 27:137–151

Wilke A, Orth J, Kienapfel H, Schroder G, Griss P (1992)
Sensitivity of a human bone marrow cell culture to test the biocompatibility of different biomaterials.
Trans 4th World Biomaterial Congress, Berlin

- Wilke A, Orth J, Landgraff M, Griss P (1995)
Die Beurteilung der Biokompatibilität von in der Orthopädie verwendeten Biomaterialien mit Hilfe einer humanen Knochenmarkszellkultur.
Orthopädische Praxis 9:636–640
- Wilke A, Orth J, Lomb M, Fuhrmann R, Kienapfel H, Griss P, Franke RP (1998)
Biocompatibility analysis of different biomaterials in human bone marrow cell cultures.
J Biomed Mater Res 40:301–306
- Wilke A (1997)
Die humane Knochenmarkszellkultur. Modell zur Biokompatibilitätstestung von orthopädisch relevanten Implantatmaterialien.
Medizinisches Zentrum für Operative Medizin II, Philipps–Universität, Marburg
- Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer (1996)
Richtlinien zum Führen einer Knochenbank.
Dtsch Ärztebl 93(34/35):2166-2171
- Wutzler P, Sauerbrei A (2000)
Virucidal efficacy of a combination of 0.2% peracetic acid and 80% (v/v) ethanol (PAA-ethanol) as a potential hand disinfectant.
J Hosp Infect 46:304-308
- Yamamoto N, Tsuchiya H, Nojima T, Sumiya H, Tomita K (2003)
Histological and radiological analysis of autoclaved bone 2 years after extirpation.
J Orthop Sci. 8(1):16-19
- Zheng MH, Wood DJ, Papadimitriou JM (1992)
What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation?
Pathol Res Pract 188(8):1104-1121
- Zoricic S, Bobinac D, Lah B, Maric I, Cvijanovic O, Bajek S, Golubovic V, Mihelic R (2002)
Study of the healing process after transplantation of pasteurized bone grafts in rabbits.
Acta Med Okayama 56(3):121-128

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	=	Abbildung
AIDS	=	acquired immune deficiency syndrome
AP	=	Alkalische Phosphatase
ATP	=	Adenosintriphosphat
AZ	=	Aktenzeichen
BCDF	=	B-cell differentiation faktot
BMP	=	bone morphogenic proteins
BSA	=	bovine serum albumine
BVDV	=	bovine viral diarrhoea virus
bzw.	=	beziehungsweise
C	=	Celsius
ca.	=	circa
CDC	=	Centers for Disease Control
CD	=	cluster of differentiation
CFU	=	colony forming units
cm	=	Centimeter
CSF	=	colony stimulating factor
dest.	=	destilata
EDTA	=	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	=	enzyme linked immunosorbent assay
EATB	=	European Association of Tissue Banks
EAMST	=	European Association of Musculo Skeletal Transplantation
Fa.	=	Firma
FACS	=	fluorescence activating cell sorter
FITC	=	Fluorescein Isocyanat

FKS	=	fetales Kälberserum
g	=	Gramm
G – CSF	=	granulocyte colony stimulating factor
GEMM	=	Granulozyten – Erythrozyten – Monozyten – Makrophagen
GmbH	=	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GMCSF	=	granulocyte – macrophage – colony stimulating – factor
HIV	=	human immunodeficiency virus
HS	=	Pferdeserum
IAEA	=	International Atomic Energy Association
IE	=	Internationale Einheit
IFN	=	Interferon
Ig	=	Immunglobulin
IL	=	Interleukin
IMDM	=	Iscove's modified Dulbecco's medium
kD	=	Kilodalton
kGy	=	Kilogray
kV	=	Kilovolt
l	=	Liter
LDH	=	Lactatdehydrogenase
LOD	=	Lactatoxidase
LMI	=	Leukozyten-Migrations-Inhibitionstest
M	=	molar
mA	=	Milliampere
mbar	=	Millibar
max.	=	maximal
M – CSF	=	macrophage colony stimulating factor
mg	=	Milligramm

MHC	=	major histocompatibility complex
Mio.	=	Million
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
mmol	=	Millimol
MW	=	Mittelwert
µg	=	Microgramm
µl	=	Microliter
µm	=	Micrometer
N ₂	=	Stickstoff
NaHCO ₃	=	Natriumhydrogencarbonat
NaCl	=	Natriumchlorid
NADH	=	Nicotinamid Adenindinucleotid Hydroeen
NCAM	=	neural cell adhaesions molecule
ng	=	Nanogramm
NKZ	=	Natürliche Killerzellen
nm	=	Nanometer
O	=	Sauerstoff
PBS	=	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PE	=	Phycoerythrin
PerCP	=	Peridin Chlorophyl
PES	=	Peroxyessigsäure
pg	=	Picogramm
POD	=	Peroxidase
REM	=	Rasterelektronenmikroskopie
Rpm	=	revolutions per minute
SAL	=	Sterility-assurance level
Stabw	=	Standardabweichung

SOP = Standard Operating Procedure

Tab. = Tabelle

TGF = transforming growth factor

TNF = Tumornekrosefaktor

U = Units

USA = United States of America

v. = von

z. B. = zum Beispiel

10 Danksagungen

Vor allen anderen möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, für ihr Verständnis und ihre Unterstützung, die mir ermöglichte meinen eigenen Weg zu gehen.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Axel Wilke für die Überlassung des Themas und die Betreuung.

Herrn Dr. med. Stefan Endres für die immer kompetente Beratung und Betreuung.

Frau Marita Kratz, die durch ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft, aber auch durch ihre Kritik zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Meinen Mitstreitern Frau Sabrina Reichel und Herrn Christoph Herzberger für die allseits zuverlässige Zusammenarbeit und die gute Teamarbeit.

Herrn Conrad Plange, der mich und meine Familie durch seine Gastfreundschaft und gönnerhafte Förderung erstaunte.

Herrn Hanspeter Aigeldinger für so manchen väterlichen Rat.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

***Vergleichende in vitro – Analyse von allogenen Knochentransplantaten
- 121°C Autoklavieren vs. 25kGy γ -Bestrahlung -***

im Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. David Jones ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher weder an einem in- oder ausländischem medizinischem Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in Teilen in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Zeitung für Orthopädie und ihre Grenzgebiete. 2005 Nov-Dec;143(6):660-8.

Poster DGU/DGOOC Kongress 2005

Marburg, den 25.02.2007

12 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Beato, Beyer, Daut, Engenhardt-Cabillic, Fischer, Geus, Görg, Gotzen, Gressner, Grimm, Griss, Hasilik, Herzum, Kern, Köhler, Kretschmer, Jungclas, Lange, Koolmann, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Oertel, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schneider, Seitz, Simon, Slenczka, Steiniger, Vogelmeier, Voigt, von Wichert, Wilke, Weihe, Werner, Westermann

13 Lebenslauf

Name:	Simon Martin Heinz
Geburtsort:	28.08.1977, Marburg an der Lahn
Ausbildung:	
1984 – 1988	Grundschule Elnhausen
1988 – 1997	Gymnasium Martin-Luther-Schule
1994 – 1995	Stipendium des Deutschen Bundtages und Amerikanischen Kongresses
1997	Abitur Gymnasium Martin-Luther-Schule
Wehrdienst:	
07/1997 – 09/1997	Unteroffizierslehrgang an der Fernmeldeschule Flensburg
03/1998	Marineoffiziersschule Mürwick
03/1998	Offiziersdiplom
03/1998 – 07/1999	Brückensoffizier im 3. Minensuchgeschwader
10/2003	Beförderung zum Oberleutnant zur See
Universitäre Ausbildung:	
10/1999 – 06/2006	Studium der Humanmedizin an Philipps-Universität Marburg
09/2001	Physikum
02/2002 – 09/2003	Famulaturen, z.B.: Olivedale Clinic Johannesburg, SA
08/2002	1. Staatsexamen
03/2005	2. Staatsexamen
04/2005 – 03/2006	Praktisches Jahr Tygerberg Hospital, Universität Stellenbosch Südafrika Universitätsklinikum der Philipps-Universität Marburg
04/2006	3. Staatsexamen
06/2006	Approbation als Arzt
Berufliche Tätigkeit:	Facharztausbildung Orthopädie und Unfallchirurgie
07/2006 – 12/2007	Assistenzarzt im St. Franziskus-Hospital, Winterberg
01/2008 - ...	Assistenzarzt in der Elisabeth-Klinik, Bigge
Sprachen:	Deutsch, Englisch,
Hobbies:	Sport, Musik, Theater, Bücher

14 Anhang

14.1 Anamnesebogen zur Knochenspende

Name: Vorname:

Geburtsdatum: PID:

Adresse:

Spenderetikett

Anamnese zur Knochenspende

Das Ihnen entnommene Knochenstück darf nur dann für Forschungszwecke verwendet werden, wenn es keine Krankheitserreger enthält. Um dies zu gewährleisten, bitten wir Sie um die Beantwortung einiger Fragen. Ihre Antworten und auch die Laborergebnisse sind vertraulich und unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht.

Mit Ihrer Bereitschaft zur Knochenspende helfen Sie nicht nur kranken und hilfsbedürftigen Mitbürgern, sondern Sie dienen auch sich selbst. Möglicherweise werden so körperliche Störungen aufgedeckt, die zu behandeln oder bei geplanten Operationen zu berücksichtigen sind.

Frage:

Haben oder hatten Sie bestimmte Verhaltensweisen, die gegenüber der Allgemeinbevölkerung mit einem erhöhten Infektionsrisiko für Hepatitis B oder C oder HIV (AIDS) einhergehen?

Ja [] Nein []

Haben oder hatten Sie Sexualkontakt(e) mit Personen mit solchem Risikoverhalten oder mit solchen Personen aus oder in Ländern der dritten Welt?

Ja [] Nein []

Frage:

Waren Sie jemals an einer ansteckenden Leberentzündung (Virushepatitis) erkrankt?

Ja [] Nein []

Frage:

Waren Sie an Malaria erkrankt, oder haben Sie sich innerhalb der letzten sechs Monate in einem Malariagebiet aufgehalten, oder sind Sie in einem solchen geboren und/oder aufgewachsen?

Ja [] Nein []

Frage:

Haben Sie nach Tropenaufenthalt innerhalb der letzten sechs Monate an unklaren fieberhaften Erscheinungen gelitten?

Ja [] Nein []

Frage:

Werden oder wurden Sie wegen einer Erkrankung an Tuberkulose behandelt?

Ja [] Nein []

Frage:

Wurde bei Ihnen eine Augenoperation mit einer Hornhautübertragung (Kornea-Transplantation) durchgeführt?

Ja [] Nein []

Frage:

Leiden oder litten Sie an einem bösartigen Tumor (Krebserkrankung)?

Ja [] Nein []

Frage:

Haben Sie während der letzten sechs Monate Blut, Blutbestandteile bzw. aus Blut hergestellte Seren und Medikamente übertragen bekommen?

Ja [] Nein []

Frage:

Haben Sie sich während der letzten 12 Monate tätowieren oder Durchbohrungen der Haut vornehmen lassen zur Befestigung von Schmuck oder anderen Gegenständen?

Ja [] Nein []

Frage:

Wurden Sie in den letzten vier Wochen mit so genannten Lebendimpfstoffen geimpft (Masern, Mumps, Röteln, Kinderlähmung, Typhus, Cholera, Tuberkulose)? Nicht gemeint sind so genannte Totimpfstoffe gegen Diphtherie, Tetanus, Grippe, Hepatitis.

Ja [] Nein []

Ich bin damit einverstanden, dass Knochenteile, die im Rahmen der bei mir durchgeführten Operation entfernt werden müssen, als Knochenspende verwendet und die erwähnten Laboruntersuchungen (unter anderem Hepatitis, HIV) gelegentlich einer Blutentnahme mit durchgeführt werden. Ich versichere, dass bei mir keiner der genannten Risikofaktoren vorliegt. Ich habe gegenüber Herrn/Frau Dr _____ alle Fragen wahrheitsgemäß beantwortet.

Ort, Datum

Unterschrift des Patienten bzw.
Sorgeberechtigten; eventuell
Unterschrift des Übersetzers

Patient erfüllt Kriterien zur Knochenspende

Ja [] Nein []

Die klinische Untersuchung des Patienten ergab keinen Anhalt für das Vorliegen Lymphknotenschwellungen, opportunistischen Infektionen, Lymphome, Soor und neurologische Erkrankungen

Ja [] Nein []

Ort, Datum

Unterschrift des Arztes

14.2 Zertifikat der durchgeführten 25kGy γ -Bestrahlung der Knochenproben



Zertifikat β (elektron)

EN ISO 9002
EN 46002

BGS Fritz-Kotz-Str. 16 51674 Wiehl
Phillips-Universität Marburg
Klinik für Unfallchirurgie
Baldinger Str.
35033 Marburg

Service

Zertifikats-Nr.: 4105301

BGS-Auftrags-Nr.: 241.02959.01
Ihre Best.: Test...

Kunden-Nr. : 100855
Datum : 18.05.2004
Seite : 1 von 1

1 Karton(s) 1 Palette(n)

Knochenprobe
Gamma OFD 25kGy

Strahlenart: Gamma
Min. Oberflächendosis [kGy]: 25,00
Bestrahlt am: 18.05.2004

Certificate of irradiation

Abbildung 14-1 Zertifikat der Firma Beta-Gamma-Service GmbH & Co. KG

Am 18.05.2004 erhielten die allogenen Knochenproben, die für den Kulturansatz ionisierender γ -Strahlung ausgesetzt werden sollten, zur gleichen Zeit und gleichen Bedingungen eine Dosis von 25kGy.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.